UNIVERSITE DE STRASBOURG — FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1929-1930 N° 55

ÉTUDE D'UNE BACTÉRIE CHROMOGÈNE NOUVELLE:

BACILLUS CITRULLI SARTORYI

Isolement et Caractérisation Chimique, Biologique, Ionométrique et Spectrographique de la Substance Chromogène Anthocyanique sécrétée par la Bactérie

---

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le Juillet 1930
A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE STRASBOURG
pour obtenir le grade de DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(MENTION PHARMACIE)

par

JEAN SEVENET
Pharmacien

Examinateurs de la Thèse:

MM. SARTORY, Professeur, *Président*
JADIN, „ } *Juges*
LOBSTEIN, „ }

STRASBOURG
IMPRIMERIE DES DERNIÈRES NOUVELLES DE STRASBOURG
1930

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG — FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1929-1930 N° 55

ÉTUDE D'UNE BACTÉRIE CHROMOGÈNE NOUVELLE:

BACILLUS CITRULLI SARTORYI

Isolement et Caractérisation Chimique, Biologique, Ionométrique et Spectrographique de la Substance Chromogène Anthocyanique sécrétée par la Bactérie

---

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le Juillet 1930
A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE STRASBOURG
pour obtenir le grade de DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(MENTION PHARMACIE)

par

JEAN SEVENET
Pharmacien

Examinateurs de la Thèse:

MM. SARTORY, Professeur, *Président*
JADIN, „ } *Juges*
LOBSTEIN, „ }

STRASBOURG
IMPRIMERIE DES DERNIÈRES NOUVELLES DE STRASBOURG
1930

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

FACULTÉ DE PHARMACIE

ADMINISTRATION

MM. JADIN, *Doyen*, ✻, ☿ I, ♁.
A. SARTORY, *Assesseur*, C. ✻, ☿ I, O ♁.
CUVIER, *Secrétaire*.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

PROFESSEURS

MM.	JADIN, ✻, ☿ I, ♁	Pharmacie chimique.
	A. SARTORY, C ✻, ☿ I, ♁ O,..	Bactériologie.
	LAVIALLE, ☿ I, ♁	Botanique.
	LABORDE, ☿ I	Chimie organique.
	VOLMAR, ☿ I	Analyse chimique.
	LOBSTEIN, ✻, ♁, ☿ I.....	Matière médicale.

CHARGÉ DE COURS

M.	GUILLAUME, ✻, ♁, ☿	Pharmacie galénique.

PROFESSEUR HONORAIRE

M. BRÆMER, ✻, ☿ I, O ♁.

COURS COMPLÉMENTAIRES

MM.	LABORDE, ☿ I	Chimie biologique.
	GUILLAUME, ✻, ☿, ♁.....	Zoologie.
	VOLMAR, ☿ I	Chimie minérale.
	LOBSTEIN, ✻, ♁, ☿ I	Hydrologie et Hygiène.
	BRÆMER, ✻, ☿ I, O ♁.....	Législation et Déontologie.
	LAPP, ☿	Physique.
	COLLARD, ♁, ☿	Toxicologie.
	R. SARTORY	Cryptogamie.

CHEFS DE TRAVAUX PRATIQUES

MM.	LAPP, ☿	Chimie pharmaceutique.
	COLLARD, ♁, ☿	Chimie et Physique.
	GARNIER, ♁, ☿.....	Histoire naturelle.
	R. SARTORY	Bactériologie et Parasitologie.

A MES PARENTS

Témoignage d'affectueuse reconnaissance

AU DOCTEUR ET A MADAME PEYRONNY

Respectueux hommage

A MA FIANCÉE

Témoignage de vive affection

A MES AMIS

A MONSIEUR A. SARTORY

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
Commandeur de la Légion d'Honneur,
Président du Jury de ma Thèse

En témoignage de vive admiration
et de respectueuse gratitude.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548014_0011

A MES JUGES ET EXAMINATEURS DE MA THÈSE

MONSIEUR JADIN

Doyen de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
Chevalier de la Légion d'Honneur

MONSIEUR LOBSTEIN

Professeur à la Faculté de Pharmacie de Strasbourg
Chevalier de la Légion d'Honneur

Hommage
de profonde gratitude

INTRODUCTION

Avant que l'on ait eu l'idée de rapporter les phénomènes de chromogenèse observés sur divers milieux minéraux ou organiques à l'influence de microorganismes, les anciens y voyaient une sorte de changement de nature de la substance sans supposer l'intervention d'un processus vital.

L'apparition de certaines colorations et le caméléonage, le changement de teinte des eaux, des matières alimentaires, des substances inertes ont sans aucun doute déjà été observés dès la plus haute antiquité par les hommes qui se sont servi pour les besoins de l'existence de la farine, du lait, du pain et autres produits nécessaires à la nutrition.

Mais les causes et la nature intime de ces phénomènes sont restées longtemps obscures; ce n'est que dans le siècle dernier que l'on a commencé à les étudier. Toutefois jusque dans ces derniers temps les connaissances sur ce sujet en sont restées au point où les avait amenées les travaux des premiers bactériologistes et chimistes.

Cependant la fonction chromogène des végétaux en général, qu'ils appartiennent aux plantes supérieures ou aux microorganismes cryptogamiques ou aux bactéries, est sans aucun doute d'une grande importance et mérite l'attention la plus vive. En effet, si l'on considère la partie la mieux étudiée de cette question : celle qui a trait à la chlorophylle et aux pigments assimilateurs des végétaux, on est frappé du progrès apporté par les découvertes et l'étude approfondie de ce pigment dans la compréhension des phénomènes vitaux et dans la physiologie et la biochimie végétale.

On a, à tort, il semble, négligé pendant trop longtemps les matières chromogènes bactériennes : ce n'est qu'à la fin du dix-neuvième siècle que ces pigments ont suscité des recherches nombreuses. Dans les différents mémoires publiés à ce sujet les auteurs se sont attachés à étudier les caractères de solubilité, l'influence des acides et des bases, des réducteurs et des oxydants sur les diverses matières colorantes.

Depuis les perfectionnements apportés aux techniques spectroscopiques et spectrographiques et l'évolution rapide de la chimie physique, les bactériologistes ont compris que le complément indispensable du microscope était l'appareillage spectrographique.

Ces procédés furent alors utilisés largement, mais une lacune subsistait : jusque dans les toutes dernières années, l'étude chimique des divers pigments microbiens ne tenta pas les microbiologistes, ceci très probablement à cause de la très grande sensibilité des matières colorées microbiennes aux réactifs chimiques et de la difficulté de les obtenir à l'état pur cristallisé.

On ne peut guère citer que les travaux de Gessard, de Lasseur, de Molisch, de Thiry et Chamot qui apportent, quant à l'étude chimique des résultats nouveaux et qui semblent d'une très grande importance.

Tout récemment c'est l'école de Willstætter d'un côté, de Wrede de l'autre, qui, avec une persévérance admirable, une science approfondie, ont enfin apporté une lumière nouvelle et des données définitives sur ces problèmes biologiques et biochimiques, dont les résultats sont de première utilité pour l'explication des phénomènes assimilateurs et du métabolisme constructeur de la cellule végétale.

Nous inspirant de toutes ces idées, nous avons cru bon de diriger nos recherches scientifiques vers ces questions et nous pensons apporter aujourd'hui une contribution inédite et des données précises par l'étude d'une bactérie chromogène nouvelle, isolée de différentes *Cucurbitacées*.

Notre travail comprend trois parties : dans la première nous envisageons l'historique de la question et nous passons en revue tous les travaux antérieurs au nôtre et nous indiquons en détail les techniques qui nous ont été nécessaires pour poursuivre nos recherches. La deuxième partie comprend l'étude morphologique et biologique du *Bacillus Citrulli*, ses caractères culturaux et biochimiques. Enfin dans la dernière partie de notre travail nous nous livrons à l'étude de la substance chromogène, en insistant particulièrement sur les conditions de production du pigment (influence des sels minéraux, de l'oxygène, de la température, etc.), les propriétés du pigment sur les milieux de culture; nous décrivons une série d'essais de séparation de la matière colorante; un procédé

spécial de purification et de caractérisation du colorant par cristallisation; enfin l'analyse élémentaire, ionométrique et spectroscopique de notre substance chromogène.

Ce travail a été conçu et mis au point dans le laboratoire de Bactériologie et Cryptogamie de la *Faculté de Pharmacie de Strasbourg*. Que Monsieur le Professeur SARTORY nous permette de le remercier bien vivement et très sincèrement de l'accueil bienveillant qu'il nous a réservé. Sa haute compétence et son expérience ont grandement facilité notre tâche. Nous tenons à lui exprimer toute notre reconnaissance.

Nous adressons également l'expression de notre gratitude à Monsieur le Professeur JADIN, Doyen de la *Faculté de Pharmacie de Strasbourg* ainsi qu'à Monsieur le Professeur LOBSTEIN qui ont accepté tous deux de faire partie de notre jury de thèse.

Notre reconnaissance et nos remerciements à Monsieur R. SARTORY, Chef de travaux et J. MEYER, Assistant, qui avec amabilité et bienveillance ont bien voulu nous guider dans nos recherches; leurs conseils avisés nous furent d'une aide particulièrement précieuse.

PREMIÈRE PARTIE

HISTORIQUE

CHAPITRE PREMIER

CHAMPIGNONS CHROMOGÈNES

Les pigments et substances chromogènes produits par les microorganismes sont restés pendant très longtemps peu étudiés.

Les premiers travaux parus à ce sujet semblent être les études biologiques effectuées par le Vénitien Bartolomeo Bizio (1) en 1819 avec le *Bacillus Prodigiosus*.

D'autre part la substance chromogène du bacille pyocyanique a été isolée pour la première fois par Fordos (2), qui mentionne que cette matière particulière se comporte comme un véritable alcaloïde (1860).

C'est seulement dans les dix dernières années du siècle précédent avec les travaux de Gessard (3), de Scheurlen (4) et Rosenberg (5), de Molisch (6), que l'étude des Bactéries chromogènes a réalisé de grands progrès. Il n'en est pas de même pour l'autre groupe de microorganismes, connus sous le nom de « *champignons inférieurs* », parmi lesquels un très grand nombre d'espèces présentent des propriétés chromogènes mal connues.

L'étude chimique et l'isolement à l'état pur cristallisable de la plupart de ces substances chromogènes, n'a pu être réalisé que dans ces toutes dernières années et nous devons citer ici les travaux fondamentaux de Formanek (7), de Lasseur (8) et surtout de Wrede (9) et son école.

Toutes ces études ont trait seulement aux substances chromogènes microbiennes, c'est-à-dire à des groupes de colorants produits uniquement par des bactéries. Il faut savoir que certains champignons inférieurs donnent aussi

naissance à des substances colorées, rentrant dans des catégories de chromogènes totalement différentes au point de vue des propriétés chimiques et physiques.

La plus grande partie des champignons pigmentés en jaune-orange ou en rouge renferment des substances appartenant au groupe des « *carotines* ».

Bachmann (1) a prouvé que la coloration de certaines *Urédinées* était due à la carotine. Zopf (2) a fait la même constatation en ce qui concerne le *Calocera viscosa (Tremellinées)*.

Les pigments de *Polystigma*, de *Nectria cinnabarina*, de diverses *Pezizacées* d'après les auteurs précédents appartiennent aussi au groupe des carotines.

D'après Zopf (12) les pigments jaune-rougeâtre, qui apparaissent souvent chez les *phycomycètes* (ex. : *Pilobolus*, *Mucor*, etc.) seraient aussi des *carotines*. Chez les champignons ce pigment se présente ordinairement sous forme de petites gouttelettes oléagineuses, sans qu'on ait pu démontrer jusqu'à présent avec netteté, si le solvent était une graisse, ou s'il s'agissait dans tous les cas d'une huile.

La *Pézizaxanthine* décrite par Sorby (13) pour l'*Aurelia aurantia* est probablement identique à la carotine.

Dans un travail ultérieur Zopf (14) indique que les carotines provenant des *hypocréacées (Polystigma* et *Nectria)* n'ont pas les caractères de la carotine du *Daucus*. Le *Polystigma rubrum* renferme d'après Zopf deux pigments, dont le rouge est prédominant.

Le *Polystigma ochraceum* Wahlenb. contient une substance, qui est une carotine jaunâtre et cristallisable, se distinguant nettement de la précédente. La forme conidienne du *Nectria Cinnabarina*, produit un colorant jaune et un autre rouge, appelé « *nectriine* ». Le pigment du *Ditiola radicata* est identique à la carotine du *Calocera*. Les carotines jaunes ont été appelées plus tard par Zopf : *lipo-xanthines*. Les carotines rouges ont reçu le nom de *lipo-rhodines*. Enfin plus tard Zopf (15) classe la polystigmine et la nectriine dans le groupe des carotinines ou carotines oxydées. De même chez les *Myxomycètes* Zopf a pu démontrer assez souvent la présence de carotine, surtout chez les genres *Stemonitis* et *Lycogala*. Le colorant de certains Lycogala est caractérisé d'après Zopf (17) par quatre bandes d'absorption dans le spectre et fait partie de la série jaune des carotines.

D'après le nombre des bandes, l'auteur distingue des di-, tri- et tétra-lipo-xanthines. Mais par suite de traces d'impuretés dans les produits, on obtient souvent des différences dans le spectre de la carotine et cette classification n'est sûrement pas justifiée. Nous possédons en outre quelques travaux sur les carotines produites par les *Saccharomycétacées*. DEMME (18) publie un travail sur *Saccharomyces ruber*, trouvé dans le lait et qui semble être l'agent de la diarrhée infantile. FRESENIUS (19) le premier, mentionne dans ses « *Contributions* à la *Mycologie* », une *levure rouge Cryptococcus glutinis*. SCHRÖTER (20) de même signale déjà en 1872 une *levure rose*, dont les membranes et le contenu cellulaire sont incolores, tandis que le milieu de culture est teinté en rouge. Quelques travaux sur des *levures roses* ont été plus tard publiés par KOCH et ses élèves; ces organismes ont été étudiés au point de vue morphologique et biologique en tous détails par HANSEN (21) et LINDNER (22).

Un autre mémoire intéressant sur un *Saccharomyces rouge* a été publié par ELFVINGS (23). Ce champignon se développe dans une solution aqueuse de sulfate de magnésie et de nitrate de potassium, en présence d'une trace de chlorure de fer sous l'action de la lumière. La vie de cette espèce en présence de la lumière solaire n'est rendue possible que grâce à la présence du pigment rouge. LAURENT (24) a isolé de myrtilles sèches une forme évolutive du *Cladosporium herbarum*, présentant l'aspect d'une *levure rose*. Le colorant n'apparaissait qu'en présence de la lumière. A l'obscurité les cellules restaient incolores. En 1892 LASCHÉ (25) décrit deux *Saccharomyces rouges: Mycoderma humili* et *Mycoderma rubrum*.

Le voile superficiel des cultures de ces levures est coloré en rouge, et cette coloration est plus foncée en milieu acide qu'en milieu légèrement alcalin. Ces deux espèces semblent identiques ou en proche parenté avec une *Torula* (*Torula* N° 36) étudiée minutieusement par JANSEN et MERTEN (26). Cette levure est très sensible à la lumière; les cellules du voile prennent une dimension beaucoup plus grande à l'obscurité, mais le voile même est alors moins coloré.

Les cellules périphériques du voile sont les plus colorées, formant un anneau collé aux parois et sont remplies par des corpuscules très réfringents à aspects graisseux et teintés en rouge-orangé. Ce champignon ainsi que le *Blastoderma*

salmonicolor décrit par FISCHER et BREBECK (27) montrent une coloration saumon dans la végétation superficielle; cette teinte est due à un pigment carotinien. En 1911 nous trouvons un travail très détaillé sur les levures rouges de O. SCHIMON (28). Cet auteur a pu isoler chimiquement la carotine et il s'exprime ainsi : « La présence de carotine n'est pas seulement limitée aux organes jaunes ou rouges, on les trouve aussi dans les parties vertes, où ils font partie des chloroplastes végétaux. » La substance chromogène isolée et étudiée la première dans le groupe des carotines est celle retirée de la *carotte*, qui a déjà été mentionnée sous ce nom en 1826 par WACKENRODER (29). Elle a été analysée plus tard par VAUQUELIN et BOUCHARDAT (30) et aussi par ZEISE (31). Ce dernier a établi pour elle la formule ($C^{5} H^{8}$) 10. HUSEMANN (32) trouvait par contre dans son produit 6 % d'oxygène et a donné la formule : $C^{18} H^{24} O$. ARNAUD (33) a démontré qu'il s'agit d'un hydrate de carbone très facilement oxydable et propose la formule : $C^{26} H^{38}$. La constitution définitive de la carotine établie par WILLSTÆTTER et MIEG (34) comme étant $C^{40} H^{56}$ a été appelée « carotène », elle fournit un produit d'addition : $C^{40} H^{56} I^{2}$. Comme réactions d'identification de la carotine on donne les réactions suivantes:

1° Par le contact de substance carotinigènes ou avec la carotine cristallisée en présence d'acide sulfurique concentré ou d'acide azotique on obtient une coloration foncée, bleu indigo, qui passe par une action prolongée du violet au jaune foncé.

2° L'acide chlorhydrique en présence de phénol ou de thymol produit d'après MOLISCH (35) aussi une coloration bleu foncé.

3° Une solution iodo-iodurée se colore en vert en présence de carotine.

4° L'acide sulfhydrique à l'état gazeux fait passer les carotines au bleu indigo. A l'état liquide par contre la teinte devient brun café. Dans les deux cas on obtient, en ajoutant de la potasse, un retour à la coloration rouge.

5° Le chlore produit avec la carotine un dérivé de substitution : la carotine tétra-chlorée, qu'on obtient sous forme de poudre blanche amorphe en faisant passer un courant sec de gaz chloré sur la carotine et en précipitant la solution

alcoolique ainsi obtenue avec de l'eau. Le carotène tétrachloré pur se colore en rouge par chauffage à 100 ° et il fond à 120 °.

Une solution alcoolique de carotène fournit les trois bandes d'absorption suivantes : (TSCHIRCH) (36)

1° $\lambda = 468$ à $\lambda = 485$
2° $\lambda = 438$ à $\lambda = 455$
3° $\lambda = 418$ à $\lambda = 430$.

Dans une solution éthérée ces trois bandes sont situées d'après KOHL (37) :

1° $\lambda = 490$ à $\lambda = 495$
2° $\lambda = 455$ à $\lambda = 445$
3° $\lambda = 430$ à $\lambda = 418$.

D'après DHÉRÉ et RYNCKI (1913) les pigments carotinoïdes *(carotine* et *xanthophyle)* présentent une transparence relative considérable pour toutes les radiations ultraviolettes jusqu'au voisinage de $\lambda = 225$.

La carotine du *Daucus* en solution chloroformique à + 15 ° fait subir à la lumière polarisée une déviation vers la gauche = - 30 °, 17 '. La littérature concernant la constitution des différents colorants fungiques du groupe de la *carotine* est considérable. Mais jusqu'à présent très peu de ces pigments ont été examinés rigoureusement au point de vue chimique et physique, et il est impossible actuellement de classer ces corps d'après leur constitution. Les travaux détaillés sur ce sujet sont rassemblés dans les publications de ZOPF (38) et NADSON (39).

Une observation très intéressante a été faite par WEHMER (40) et VUILLEMIN (41).

D'après ces auteurs le *Mucor rouxii*, champignon de la levure chinoise, cultivé sur milieu de riz, produit un pigment jaune orangé très caractéristique, qui apparaît sous forme de gouttelettes à l'intérieur de la cellule et qui peut être obtenu à l'état cristallisé.

Le même pigment se forme en outre, si on cultive ce champignon sur milieu de pomme de terre en présence de bactéries saprophytes. Sur des solutions sucrées le mycelium de ce champignon reste incolore. Un grand nombre d'observations concernant les variations du pigment sous l'action des facteurs extérieurs est relaté dans les publications de

Milburn (42) sur l'*Hypocrea rufa* et de Bessey (43) sur différents genres de *Fusarium*. Le pigment rouge très prononcé du *Monascus purpureus*, qui est employé en Asie sous le nom de « *Ang-Khak* » pour colorer des produits alimentaires et des boissons, a été analysé par Prinsen Geerligs (44) et par Boorsma (45). Le pigment est soluble dans l'alcool, l'éther et le chloroforme. On peut, d'après Boorsma, décomposer le colorant par l'action de la soude en deux constituants : l'α oryzaerubine et la β oryzaerubine. Geerligs croit que cette matière colorante est un dérivé anthraquinonique. Le pigment foncé des conidies de l'*Aspergillus niger*, appelé *aspergilline*, est, d'après les travaux de Linossier (46), soluble, donnant une coloration brun rougeâtre aux solutions ammoniacales et aux solutions alcalines diluées. Ces liquides sont alors facilement oxydables.

Le pigment est soluble dans l'alcool; les cendres de l'*aspergilline* renferment des traces de fer et Linossier croit que ce pigment joue un rôle dans la respiration du champignon. Le colorant brun violet de l'*ergot* de *seigle* a été déjà examiné par Vauquelin(47). La *sclérerythrine* est soluble dans l'alcool et les alcalis donnant une coloration rouge violet; elle précipite par les sels alcalino-terreux (Draggendorff et Podwyssotzky (48). Les propriétés physiques et chimiques ont été étudiées par Palm (49) et par Tichomirow (50). Les autres pigments violets très répandus chez les champignons sont probablement de même nature que les précédents. Des études détaillées sont cependant nécessaires pour mettre au point ces questions.

Sur les colorants cryptogamiques rouges, qui existent en très grand nombre, nous possédons surtout des travaux concernant les champignons supérieurs. Nous mentionnerons ici les publications de A. Weiss (51) sur les pigments de *Russula*, celle de Reinke (52) sur la mycoporphyrine cristallisable du *Penicilliopsis clavariiformis*, celle de Phipson (53), concernant la rubérine de l'*Agaricus ruber*, celles de Griffiths (54) qui a établi la formule $C^{19} H^{18} O^{6}$ pour l'*amanitine*. *L'acide luridique* et *pantérinique* ont été isolés par Bœhm (55). Le pigment rouge carmin des *lactaires*, qui se colore en violet en présence des alcalis, a été déterminé par Taylor (56). Bachmann (57) a examiné le colorant violet du *Lactarius deliciosus*.

Le pigment rouge des *Téléphoracées*, l'acide téléphorique, a été obtenu cristallisé par Zopf (58). La matière chromogène rouge des *Russules* est soluble dans l'eau et dans l'alcool dilué avec une teinte rouge présentant une fluorescence bleue. Les alcalis colorent ces solutions en jaune. La *Bulgariine* et la *Bulgarcoeruleïne* sont d'après Zopf (59) les pigments rouges et bleus des genres *Bulgaria*. En outre ces champignons renferment un pigment rouge, soluble dans l'eau, la *Bulgarérythrine*. Un grand nombre de ces colorants a été rapproché de l'*anthracène* et de l'*anthraquinone*. L'acide *rhizopogonique*, le colorant rouge cristallisé du *Rhizopogon rubescens*, correspond d'après Oudemans (60) à la formule $C^{14} H^{18} O^2$; il est soluble dans l'alcool et se colore avec les alcalis en violet.

Stahlschmidt (61) a isolé l'acide *polyporique*, le colorant des polypores et l'a obtenu à l'état cristallisé, correspondant à la formule $C^9 H^7 O^2$. Les sels alcalins de cet acide donnent des solutions aqueuses rouge-violet; par action du zinc, en présence de potasse, on obtient une odeur caractéristique de benzaldéhyde.

Thiry (62) a examiné le colorant rouge de l'*Actynomyces* mordoré. Si on traite une culture mordorée par du chloroforme ordinaire, le réactif se colore en rouge pourpre. Si alors à cette solution, on ajoute de l'eau et quelques gouttes de soude, l'eau qui surnage le chloroforme se colore en un beau bleu de ciel, tandis que le chloroforme se décolore complètement. Par addition d'acide la solution bleue vire au rouge et le chloroforme extrait de nouveau la matière colorante. La solution chloroformique évaporée donne de grands cristaux pourpres allongés, avec angles très nets; mais l'auteur ne détermine pas la composition de la substance chromogène.

Nous ne croyons pas utile de continuer plus loin l'énumération de ces colorants mycosiques, vu l'importance secondaire que semblent jouer ces substances dans la physiologie végétale. Nous avons vu que la plus grande partie de ces matières chromogènes entre dans le groupe des carotines; les colorants mycosiques ne faisant pas partie des carotines sont beaucoup plus faciles à isoler et à obtenir à l'état cristallisé, si on les compare avec les colorants bactériens.

CHAPITRE II

LES BACTÉRIES A PIGMENT BLEU, VIOLET OU ROUGE

A plusieurs reprises déjà on a pu démontrer que des bactéries colorées en jaune orangé produisaient une *carotine*. Parmi celles-ci Zopf (63) a mentionné le *Staphylococcus rhodochrous*, le *Micrococcus superbus*, *le Micrococcus stellatus*, et d'autres enfin produisant la *carotine*. Cette substance peut être mise en évidence par la réaction des *lipocyanes:* on épuise les cultures au moyen d'éther de pétrole; quelques gouttes du produit concentré obtenu sont mises en présence de traces d'acide sulfurique concentré. Cette réaction pratiquée sur une lame donne des cristaux microscopiques bleu foncé.

Zopf (64) a ensuite caractérisé une carotine chez le *Bacterium egregium* et chez le *Micrococcus erythromyxa*. Schröter (65) a mis en évidence une carotine chez *Sarcina aurantiaca* et chez *Staphylococcus pyogenes aureus*. Le colorant est sécrété par les bactéries vivantes et forme un dépôt cristallin. Toutes ces bactéries renfermant de la carotine, ont leur contenu cellulaire coloré et doivent être distinguées des nombreuses autres formes, qui sécrètent un pigment dans le milieu ambiant, mais dont le corps bactérien reste invariablement incolore. Beijerinck (66) a appelé ce dernier groupe de bactérie pigmentée : Bactéries « chromopares ». Les formes, où le colorant sécrété est fortement lié à la membrane cellulaire, sont d'après Beijerinck des bactéries « *parachromopares* ». Se basant sur ces faits Lehmann et Neumann (67) ont établi pour le genre *Bacterium* la classification suivante :

1° Bactéries ne présentant pas de pigment extra- ou intra-cellulaire.

2° Bactéries produisant dans les cultures sur milieu solide un pigment jaune (verdâtre ou orangé) sans fluorescence du milieu lui même.

3° Bactéries à pigment rose, rouge ou rouge-brun sur milieu solide.

4° Bactéries à pigment violet ou bleu noir, non diffusible dans les cultures sur milieux solides.

5° Bactéries à colonies microbiennes incolores ou très peu teintées. Diffusion d'un pigment jaune-vert ou bleu-vert fluorescent.

6° Bactéries à cultures microbiennes claires; le milieu de culture environnant est par diffusion coloré d'une façon intense brune.

Au moyen de cette classification nous pouvons donc séparer tout d'abord un groupe de bactéries chromogènes produisant des pigments à matière fluorescente; celles-ci, d'après les recherches de THUMM (68), sont toutes identiques et LEHMANN propose de les réunir sous le nom de Bactériofluorescéine. Elle se présente desséchée sous une forme amorphe, jaune-citron, soluble dans l'eau et dans l'alcool dilué, insoluble dans l'alcool fort, l'éther et le sulfure de carbone. La solution aqueuse concentrée est orangée; diluée elle est jaune-claire; en réaction acide elle n'est pas fluorescente, elle donne une fluorescence bleue en réaction neutre, et en réaction alcaline une fluorescence verte.

D'autre part, nous voyons immédiatement que nous avons affaire à deux catégories de colorants, les uns, solubles dans l'*eau* et les liquides aqueux, les autres, insolubles dans l'eau et solubles dans les *solvants organiques* ordinaires. De ce fait, le premier groupe de colorants serait dû aux bactéries chromopares de BEIJERINCK, le dernier groupe serait produit par les bactéries parachromopares et les bactéries chromophores. Les pigments rouges et jaunes rentrent presque tous dans cette classe et les mieux étudiés peuvent être divisés en deux sous-classes :

Le groupe de *carotines*, dues à des bactéries, presque uniquement chromophores, traitées déjà antérieurement.

Le groupe de la *Prodigiosine* produit par des bactéries nettement parachromopares; nous reviendrons dans un chapitre ultérieur sur les détails de cette matière colorante.

En ce qui concerne les pigments bleus et violets les faits sont beaucoup plus intéressants, parce qu'un assez grand nombre de bactéries bleues ou violettes peuvent être, soit chromophores, soit parachromopares.

Le représentant typique de ce dernier groupe est le *bacterium Violaceum* Schröter, étudié à fond par Schneider (69). Un autre bacille violet a fait l'objet de recherches de la part de Lasseur et Girardet (70).

Le pigment violet la *janthine* est insoluble dans l'eau, facilement soluble dans l'alcool, insoluble par contre dans l'éther, la benzine et le chloroforme. En solution alcoolique, en présence des acides forts ou de l'ammoniaque, il vire au vert ou au bleu-verdâtre. Il se décolore par l'action de l'acide sulfurique et du chlorure de zinc. La substance desséchée passe au jaune sous l'action de l'acide sulfurique concentré, au vert émeraude sous l'action de la lessive de soude.

Les bactéries *chromopares* à pigment bleu, avec le *Bacillus Pyocaneus* et le *Bacterium syncyaneum* comme types, sont, entre toutes les bactéries colorées, les mieux étudiées. Le *Bacterium syncyaneum* et ses pigments ont été examinés par Hueppe et Thumm (71) et par Lehmann (72). Les deux premiers auteurs ont examiné des souches, qui ne formaient que le pigment bleu. La *syncyanine* est très peu stable, les acides faibles n'ont pas d'action sur la leucobase; les acides forts, sulfuriques ou chlorhydriques, la colorent en violet; l'acide acétique lui donne une teinte sale. La lessive de soude la colore en rouge jaune; le changement de teinte se produit aussitôt que la réaction acide commence à disparaître; à la longue la couleur devient rouge-brun; ainsi s'explique la nuance des vieilles cultures.

Quant aux propriétés de la *pyocyanine* ($C^{14} H^{44} N^2 O$), matière chromogène bleue du *Bacillus Pyocyaneus*, étudiée par Gessard, Thumm et plus récemment par Lasseur, Wrede et Strack, nous aurons l'occasion de les décrire dans un chapitre ultérieur avec tous les détails et avec les conceptions les plus récentes.

Nous mettons à la fin de ce chapitre un tableau énumérant à peu près toutes les bactéries à pigment rouge et bleu, que nous avons pu trouver dans la littérature, et nous donnons leurs propriétés morphologiques et culturales. Ce tableau nous permettra de faire une comparaison entre la bactérie isolée et expérimentée dans ce travail et les autres organismes chromogènes décrits antérieurement.

Il ne nous reste qu'à citer ici un groupe de bactéries *chromopares*, très peu étudiées jusqu'à présent et dont nous avons pu trouver deux exemplaires : le *Bacterium coelicolor*,

R. Müller (73), et le *Bacterium anthocyaneum*, Lehmann et Reiss (74). Le pigment, appelé par Reiner-Müller *anthocyanine* est d'une couleur bleu-ciel, qui est soluble seulement dans l'eau et l'alcool faible, il n'est pas cristallisé, n'est pas altéré par le chauffage prolongé à + 60 °, mais est décoloré par l'ébullition et par l'eau oxygénée. Les acides le colorent en rouge , les bases en vert. C'est aussi le pigment des *Actynomyces* d'après Lehmann. Nous aurons l'occasion de revenir sur ce travail de R. Müller, car nous allons voir que la bactérie isolée et étudiée par nous se range, de par ses propriétés chromogènes, dans ce groupe.

Ajoutons, pour compléter ce petit résumé des travaux antérieurs au sujet des bactéries pigmentées, un mot sur les colorants bruns ou noirs, que l'on voit diffuser de maintes cultures dans le milieu qui les porte. Ce sont des corps voisins ou identiques des produits d'oxydation de la *tyrosine*. A ce groupe appartient le pigment des *Actinomyces chromogènes* et de diverses races de *Bacillus pyocyaneus*. Sur les milieux qui renferment de la *tyrosine*, ces pigments prennent naissance avec beaucoup plus d'intensité. Les pigments des *Bactéries noires* sont encore peu étudiés. D'après Marpmann (75) ces colorations sont en rapport avec la présence d'ions ferriques dans les milieux. Rappelons encore le beau travail de Lasseur (76) sur le *Bacillus chlororaphis*, pour les bactéries vertes, la monographie intéressante de Molisch (77) au sujet de *Bactéries purpuriques*, qui avec le secours de leur pigment, transforment les matières organiques en rayons lumineux et le mémoire de Thiry (78) sur le *Bacille polychrome*.

TABLEAU

Caractères culturaux — Propriétés biochimiques

NOM DU BACILLE	Morphologie: Bacille	Morphologie: Diamètre sup. à 1 µ	Morphologie: Mobilité	Morphologie: Spores	Tubes de bouillon: Flocons	Tubes de bouillon: Trouble	Tubes d'agar: Sombre	Tubes d'agar: Plissé	Gélatine en plaques : développement	Gélatine en piqûres: En entonnoir	Gélatine en piqûres: Dév. en surface	Gélatine en piqûres: Dév. en aiguille	Pomme de terre: Visible	Pomme de terre: Luxuriant	Tubes de fermentation: Poussent à + 37°	Tubes de fermentation: Anaérobies facultatifs	Liquéfaction: Gélatine	Liquéfaction: Caséine	Liquéfaction: Sérum	Production de gaz: Bouillon dextrosé	Production de gaz: Bouillon lactosé	Production de gaz: Bouillon saccharosé	Réduction des nitrates	Production d'indol	Lait: Acide et coagulation	Lait: Alcalin	Odeur fécale	Tubes d'agar: Chromogène	Tubes d'agar: Fluorescence
B. prodigiosus I, II, III ..	+	—	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	—	—	+	—	++	—	—	+	—
B. prodigiosus IV, VI, VII	+	-	+	-	+	+	—	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	—	+	+	—	++	—	—	+	—
B. prodigiosus V	+	-	+	-	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	—	+	+	—	++	—	—	+	—
B. prodigiosus VIII	+	-	+	-	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	—	+	+	—	++	—	—	+	—
B. ruber indicus III	+	-	+	-	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	—	+	+	—	++	—	—	+	—
B. ruber plymouthensis I, II, III	+	-	+	-	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	—	+	+	—	++	—	—	+	—
B. Kiliensis, B. ruber balticus	+	—	+	-	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	—	++	—	+	+	—
B. Miniaceus, I, II, III ...	+	—	+	—	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	—	++	—	—	+	—
B. rutilus (n. sp.)	+	-	+	-	—	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	+	+	+	—	++	—	—	+	+
B. amyloruber (n. sp.) ...	+	-	+	—	—	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	+	—	++	—	—	+	—
B. fuchsinus	+	—	+	-	—	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—	—	—	+	—	——	—	—	+	—
B. ruber Miquel	+	—	—	—	+	+	—	—	+	—	+	+	+	+	+	+	—	—	—	+	—	—	+	—	++	—	—	+	—
B. rubricus (n. sp.)	+	—	—	—	+	+	—	—	+	—	+	—	+	+	+	+	+	—	+	—	—	—	—	—	——	—	—	+	—
B. rufus (n.sp.)	+	—	—	-	+	+	—	—	+	—	+	—	+	+	+	—	+	—	+	—	—	—	—	—	——	+	—	+	—
B. ruber Zimmermann.....	+	—	+	—	+	—	—	—	+	—	+	—	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	——	+	+	+	+
B. havaniensis	+	—	—	—	+	—	—	—	+	—	+	—	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	——	—	—	+	—
B. lactis erythrogenes I, II	+	—	—	—	+	+	—	—	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	+	—	—+	+	+	+	+
B. rubefaciens	+	—	+	—	+	+	—	—	+	—	+	+	+	+	—	+	—	—	—	—	—	+	—	++	—	—	—	+	—
B. lactorubefaciens	+	—	+	—	+	+	—	—	+	—	+	+	+	+	—	+	—	—	—	—	—	—	+	—	—+	—	—	—	+
B. rutilescens (n. sp.)	+	—	+	—	+	+	—	—	+	—	+	+	+	+	—	+	+	—	+	—	—	—	+	—	++	—	—	—	+
B. mycoides roseus	+	—	+	—	+	—	+	+	+	—	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—	—	+	—	——	+	—	+	—
B. mycoides coralinus(n.sp.)	+	—	—	-	+	+	—	—	+	—	+	+	+	+	—	—	—	+	-	—	—	—	+	—	——	+	—	+	—
B. latericeus (?)	+	—	—	—	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—	-	—	—	—	—	—	——	—	—	+	—
B. rubro pertinctus	+	—	—	—	+	—	+	+	+	—	+	+	+	+	—	—	—	—	-	—	—	—	—	—	——	+	—	+	—
B. rosaceus métalloïdes ...	+	—	+	—	+	+	—	—	+	—	+	+	+	—	+	—	+	—	-	—	—	—	—	—	++	—	+	+	—
B. mensentericus ruberI-IV	+	—	+	+	+	+	—	—	+	—	+	+	+	+	+	—	+	—	-	—	—	—	—	—	++	—	+	+	+
B. rubidus (Eisenberg) ..	+	—	+	—	+	+	—	—	+	—	+	+	+	—	—	+	+	—	-	—	—	—	—	—	——	—	—	rouge	—
B. ruber aquatilis (Lustig) .	+	—	+	.....	.....	+	—	—	+	+	+	+	+	—	+	+	+	.....	+	.....	.....	.....	.....	.....	++	—	.....	rouge	.....
B. sardinae (Du bois St. Sévrin)	+	—	+	.....	+	+	—	—	+	+	+	+	+	+	+	.....	+	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B. carneus (Tils)	+	—	+	—	.....	.....	—	—	+	+	+	+	+	+	.....	.....	+	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B. ruber Berolinensis (Fraenkel)	+	—	+	—	.....	.....	—	—	+	.....	+	+	+	+	.....	.....	+	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B. sulfureus (Holzschewnikoff)	+	.....	+	—	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	+	+	+	.....	+	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B. subfulvus (Matzuschita) B. tuberigenus 4 (Gonnermann)	+	.....	+	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	+	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B. pneumonicus agilis (Schon)	+	.....	+	—	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	+	.....	.....	+	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B. viguali (Matzuschita) (B. Vigual)	+	.....	+	—	+	+	.....	.....	+	.....	+	.....	+	rouge	.....	—	+	.....	+	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B. liquefaciens communis (Sternberg)	+	.....	+	—	.....	.....	—	—	—	.....	.....	.....	+	.....	.....	+	+	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B. pyocinnabareus (Ferchmin)	+	—	—	—	+	+	—	—	+	—	+	+	rouge écarlate +	rouge	+	—	+	.....	+	.....	.....	.....	.....	.....	...+	—+	...	.....	.....
B. Thévénin	+	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B. ruber lactis (Conn) ...	+	—	—	—	—	—	—	+	—	—	.....	.....	+	+	+	+	.....	+	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	+—	+	.....	rose .....
B. rubiginosus (Kern)	+	+	—	.....	+	+	—	—	+	—	+	+	.....	.....	.....	+	+	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	jaune rouge
B. tuberosus (Kern)	+	—	—	—	+	+	—	—	—	+	+	+	.....	.....	.....	+	+	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	+ rouge
B. rubescens (Zimmermann)	+	—	—	—	.....	+	—	—	+	—	+	+	sec	.....	—	—	+	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B. velatus (Matzuschita) .	+	.....	—	.....	.....	.....	.....	.....	+	.....	.....	.....	+	rouge	—	—	+	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B. colere laterum	+	—	—	—	—	—	—	—	+	—	+	+	+	.....	+	.....	+	+	.....	—	.....	.....	.....	.....	–	++	—	.....	.....
B. exiguus (Wright)	+	—	—	—	.....	+	—	—	—	+	+	+	+	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B. Haematoides (Wright) .	+	—	—	—	.....	.....	—	—	.....	.....	.....	.....	+	.....	—	.....	+	.....	.....	—	.....	.....	.....	.....	.....	——	+	.....	.....
B. epsilon (Dyar)	+	—	—	—	.....	.....	—	—	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	+	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	++	.....	.....	rose .....
B. zeta (Dyar)	+	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	+	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	++	.....	.....	rouge .....
B. delta (Dyar)	+	—	—	.....	.....	.....	—	—	.....	.....	.....	.....	+	—	rose	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	—+	.....	.....	.....
B. ferrugineus (Dyar)	+	.....	—	.....	—	.....	+	—	+	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	—	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	—+	.....	.....	brique .....
B. finitimus ruber (Dyar) .	+	—	—	.....	—	.....	—	—	—	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	—	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B. salmoneus (Dyar)	+	—	—	.....	—	.....	—	—	—	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	saumon .....
B. rhodochrous Overbeck (Dyar)	+	—	—	.....	—	.....	—	—	—	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	—	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	rose .....
B. rubefaciens pyogenes (Dyar)	+	—	—	.....	—	.....	—	—	—	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	—	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	rose .....
B. rubefaciens pyogenes (Matzuschita)	+	—	+	—	+	+	—	+	.....	—	+	+	+	+	+	.....	—	.....	.....	—	—	.....	.....	+	—+	—	.....	.....	+
Bact. rubrum (Migula) ...	+	+	—	—	.....	.....	—	—	+	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	—	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	rouge .....
Bact. erythromyxa Zopf (Migula)	+	—	—	—	.....	+	—	—	+	.....	.....	.....	+	—	+	—	—	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	——	—	.....	rose .....
B. rubescens (Jordan)	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	.....	.....	—	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	——	—	.....	rouge .....
Bact. carnosum (Kern)....	+	—	—	—	+	—	—	—	-	—	+	+	.....	.....	.....	+	—	.....	.....	+	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	rouge
Bact. roseum (Losski)	+	—	—	—	+	+	—	—	—	—	+	+	+	rouge-âtre	+	.....	—	.....	—	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	rose .....
B. nitrogenes (Matzuschita) B. denitrificans II, (Burri and Stutzer)	+	—	+	—	+	+	—	.....	+	—	+	+	+	+	+	.....	—	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	rouge .....
B. rubescens (Matzuschita (B. oogenes hydrosulfureus j. Zörkendörfer	+	—	+	—	+	—	—	—	.....	—	+	+	+	+	—	—	—	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	rose .....
B. subrubiginosus (Maschek)	+	.....	+	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	+	.....	.....	.....	—	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B. lupini (Matzuschita) ...	+	.....	+	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	+	.....	.....	.....	—	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B. pseudomycoides(Migula)	+	.....	—	+	.....	.....	—	—	+	.....	+	+	.....	.....	.....	.....	+	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	rouge .....
B. coccineus (Pansini)	+	.....	—	+	—	+	—	—	+	+	+	+	+	+	.....	.....	+	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B. rubellus (Okada)	+	—	+	+	.....	+	.....	.....	+	—	+	+	.....	.....	.....	.....	+	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B. thermophilus liquef. aerobius (Oprescu)	+	.....	—	+	+	+	.....	.....	.....	.....	.....	.....	+	+	+	+	+	.....	+	—	—	.....	.....	—	++	.....	.....	.....	rouge .....
B. mycoides ruber (Matzuschita)	+	.....	+	+	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	+	+	+	.....	+	+	.....	—	.....	.....	.....	.....	—	.....	.....	.....	rouge .....
B. Danteci(Le Dantec) ...	+	.....	+	+	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	+	—	.....	.....	+	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B. apicum (Canestrini) ...	+	.....	+	+	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	+	.....	.....	.....	+	.....	+	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
B. rubiginosus (Catiano) ..	+	—	+	+	—	—	.....	.....	+	—	+	+	+	.....	+	+	—	.....	.....	—	.....	.....	.....	.....	.....	——	--	...	rouge .....
B. subcocconeus (Catiano).	+	—	+	+	—	—	.....	.....	+	—	+	+	+	.....	+	.....	—	.....	.....	—	.....	.....	.....	.....	.....	+- +	—	.....	orange .....
B. kermesinus (Tartaroff) .	+	+	+	+	.....	+	+	+	—	.....	+	.....	+	—	.....	.....	—	.....	—	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	rouge .....
B. rosaceus margarineus (Jolles and Winkler) ...	+	—	+	+	.....	.....	—	—	+	—	+	—	+	—	.....	—	—	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	rose .....
B. subrubeum (Kern)	+	.....	—	+	.....	+	—	—	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	—	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....
Bact. Coelicolor R. Müller	+	+	—	—	-	+		+	+	+	+	—	+	+	+	—	+	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+		bleuâtre
Bac. Citrulli Sartoryi	+	+	+	—	+	+	—	+	+	+	+	+	+	—	+	+	—	+	—	--	—	—	!	+	+	—	—	rouge	—

CHAPITRE III

PRINCIPALES SUBSTANCES CHROMOGÈNES BACTÉRIENNES BLEUES OU ROUGES ÉTUDIÉES JUSQU'A PRÉSENT

A. La Prodigiosine

B. La Pyocyanine.

C. Les Anthocyanes.

Nous tenons à donner dans ce chapitre un petit historique sur les travaux qui ont été effectués concernant ces trois sortes de pigments bactériens, recherches de longue haleine, démontrant en même temps l'évolution de la Bactériologie vers les sciences physico-chimiques et biochimiques.

A. La Prodigiosine

Les travaux fondamentaux sur le *bacillus prodigiosus* et son pigment ont été effectués, si nous respectons l'ordre chronologique, par Bartholomeo Bizio en 1819, par Erdmann (79) en 1886, par Schrœter (80) en 1875, par Griffith (81) en 1892, par Scheurlen (82) et Schottelius (83) (1887 à 1896), par Schneider (84) en 1887, par Rosenberg (85) en 1897. Puis vient en 1902 l'important mémoire de Kraft (86). Pendant très longtemps les études de cet organisme et de son pigment sont restées stationnaires. C'est seulement en 1927 que Lasseur et Girardet (70) ont repris l'étude du pigment. Ces auteurs ont examiné la *prodigiosine* surtout au point de vue de ses propriétés physiques et ils étudient minutieusement le spectre d'absorption de ce colorant en le comparant avec le pigment du *Bacillus kiliensis* et celui de l'*oxy-chlororaphine* réduite.

Malheureusement Lasseur et Girardet n'ont pas réussi, non plus, à faire cristalliser la *prodigiosine* et ils se sont contentés de travailler avec le colorant purifié et obtenu par extraction alcoolique et éthérée. La substance brun-

rougeâtre, offrant des reflets métalliques, lorsqu'elle est en suspension dans l'eau, est purifiée par l'analyse capillaire. Cette matière permet aux auteurs de constater que les pigments sécrétés par le *Bacillus kiliensis* et le *Bacillus prodigiosus* paraissent identiques et qu'il existe un rapprochement très net entre la *prodigiosine* et le *pigment violet* du *Bacillus violaceus*, tout d'abord par la bande commune de la prodigiosine avec l'oxy-chlororaphine réduite : $\lambda = 537{,}4$ et ensuite par les trois bandes de l'oxychlororaphine identiques à celles du pigment violet: $= \lambda\ 704{,}8$; $\lambda = 637{,}6$; $\lambda = 587$.

En outre dans l'ultra violet, la prodigiosine et le pigment violet ont encore deux bandes communes : $\lambda = 280$; $\lambda = 266$.

Ainsi nous trouvons un premier rapprochement entre ces pigments bactériens, paraissant à première vue bien différents. Mais le seul moyen de classer définitivement ces colorants et de se faire une idée exacte de la synthèse biologique de ces pigments par les bactéries mêmes, réside dans l'étude chimique. A ce point de vue les travaux récents de Wrede et Hettche (87) ont marqué un grand pas en avant; malheureusement ces travaux ne sont pas encore terminés au moment où nous écrivons ces lignes; toujours est-il que ces auteurs sont arrivés pour la première fois à isoler à l'état cristallin le pigment du *Bacillus prodigiosus*, qu'ils ont pu préparer une série de sels purs et mettre au point les réactions permettant la caractérisation de ces combinaisons; ils ont constaté que le pouvoir tinctorial de la *prodigiosine* était très élevé et que les expériences faites antérieurement avec les substances chromogènes non cristallisées portaient sur des solutions renfermant environ 2 % du pigment. La *prodigiosine* pure est soluble dans les liquides lipoïdiques, insoluble dans l'eau; la solution neutre ou alcaline passe par addition d'acide du jaune au rouge. La *prodigiosine* était libérée des corps bactériens par destruction de ceux-ci dans des solutions alcalines diluées, puis extraite de cette solution par l'éther de pétrole. L'extrait jaune, ainsi obtenu, fournit le pigment par précipitation à l'état de sel chlorhydrique. Celui-ci est dissous en solution alcoolique, puis on précipite avec une solution à 5 % d'acide perchlorique le sel perchlorique, qui est très bien cristallisé. Le perchlorate de prodigiosine est ensuite employé pour régénérer la prodigiosine libre, qu'on obtient en plaquettes amorphes; celles-ci pré-

sentent un éclat vert rappelant la fuchsine. De la base purifiée et libérée des cendres on peut préparer des sels magnifiquement cristallisés au moyen de l'acide perchlorique, l'acide picrique, l'acide salicylique et l'acide benzoïque. Le sel de l'acide tartrique se distingue de tous les autres par sa solubilité partielle dans l'eau. La formule moléculaire établie par ces auteurs serait définitivement $C^{20} H^{25} N^{3} O$, Ac (Ac = acide monovalent).

Le professeur Formanek, ayant analysé ces sels spectroscopiquement, a constaté que le perchlorate de prodigiosine en solution alcoolique présente deux bandes d'absorption :

5375 Å. E. et 5010 Å. E.

en solution toluénique : 5415 Å. E. et 5050 Å. E.;
en solution tétrachlorique : 5430 Å. E. et 5055 Å. E.

Par la suite le professeur Formanek conclut que la prodigiosine n'a rien de commun avec un dérivé rosanilique. Aussi la résistance à la photolyse n'est pas réelle : des bandes de papier-filtre colorées au moyen des sels se décolorent assez vite à la lumière du jour. L'intensité de coloration est à peu près analogue à celle des sels purs de fuchsine.

Au moment où nous écrivons ces lignes l'étude de la prodigiosine n'est pas plus avancée, mais nous voyons que les constatations de Lasseur et Girardet ont été vérifiées et il n'est plus douteux aujourd'hui que la prodigiosine soit en parenté étroite avec l'*oxychlororaphine ;* en comparant les formules globales à présent établies :

oxychlororaphine $C^{14} H^{11} N^{3} O$
prodigiosine $C^{20} H^{25} N^{3} O$

il semble que la prodigiosine soit un homologue supérieur de l'oxychlororaphine et nous aurons par conséquent des pigments rentrant dans un même groupe de colorants et rapprochant les *Bacillus chlororaphis, Bacillus violet, Bacillus prodigiosus.*

B. La Pyocyanine

« On ne peut pas étudier, dit Lasseur, le Bacille Pyocyanique sans évoquer immédiatement le nom de C. Gessard (88) et rappeler une partie des belles recherches de ce savant. »

Gessard a démontré que le *Bacillus pyocyaneus* peut produire 4 pigments :

une matière colorante bleue : la *pyocyanine* de Fordos,

une substance colorée fluorescente,

une matière colorante rose ou rouge,

un pigment rouge-brun mélanique.

La fluorescence s'observe dans les cultures de plus de 50 espèces bactériennes et n'a donc aucune valeur de diagnostic. Les pigments rouges et noirs ne définissent pas suffisamment l'espèce *pyocyanique*. Seule la *pyocyanine* est spécifique et caractérise le *Bacille pyocyanique*. C'est la raison pour laquelle nous limiterons notre étude à cette matière chromogène.

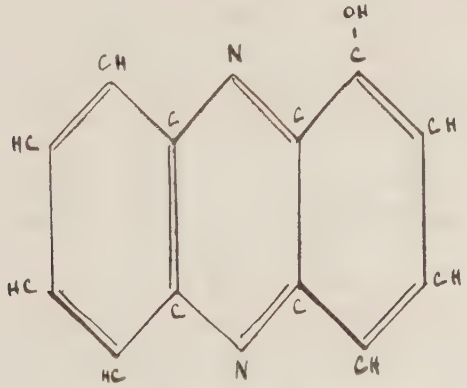
Fordos (89) a déjà pu obtenir cette substance cristallisée. Nous n'insisterons plus sur ces procédés, car dans un travail de haute valeur Wrede et Strack (90) ont pu isoler la *pyocyanine* en toute pureté; ils ont enfin défini la constitution et la composition exacte de cette substance et finalement ils sont arrivés à réaliser sa synthèse. Nous allons donc dans ce chapitre décrire aussi brièvement que possible les travaux et les résultats de ces savants.

Pour obtenir un maximum de pigment les auteurs ont pu constater que le milieu de culture doit être ajusté à un pH initial de 7,4. Dans ces conditions la production de la matière colorante atteint un maximum. La présence de 1 % de peptone dans le milieu de culture est en outre inutile. Il semble se produire une réduction du colorant, donnant naissance à un produit incolore qui, par agitation à l'air, prend la teinte bleue typique. L'extraction de la substance colorée a été effectuée par le chloroforme comme dans le procédé de Fordos-Gessard.

La meilleure méthode pour séparer le colorant de la solution chloroformique, est sans aucun doute celle qui fait usage de l'acide picrique en solution chloroformique. Le picrate formé précipite alors presque complètement à l'état de fines aiguilles. Par cristallisation dans l'alcool absolu, on peut alors l'obtenir à l'état de pureté. De la même façon on arrive à préparer le picronolate. En décomposant le picrate par acidification au moyen de l'acide chlorhydrique et extraction de l'acide picrique par le chloroforme, on obtient une

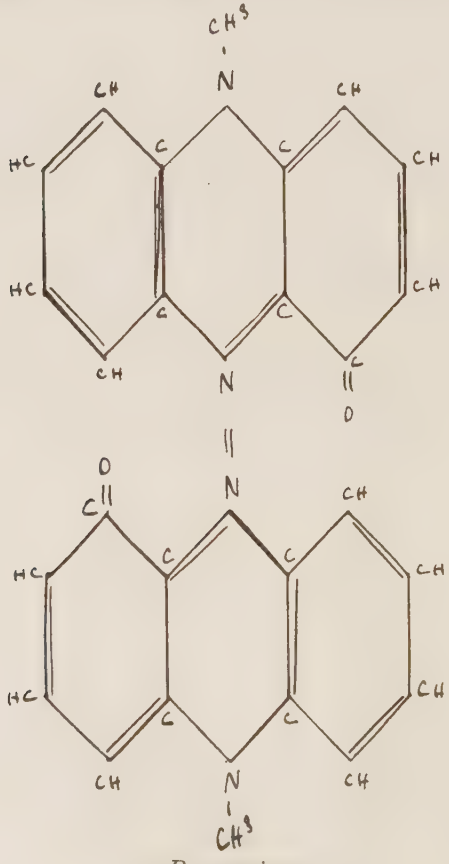
solution de chlorhydrate de pyocyanine, qui donne par évaporation de beaux cristaux. Le sel de chlorhydrate est soluble dans l'eau et dans l'alcool. La solution aqueuse est employée pour la préparation de superbes cristaux de *chloro-aurate* et de *chloro-platinate*, dont la formule globale est : $C_{26} H_{20} N_4 O_2$, $H_2 Pt Cl_6$. La composition de la pyocyanine indiquée par LEDDERHOSE (91) (1888) avec la formule : $C_{14} H_{14} N_2 O$, et par MADINAVEITIA en 1916, qui examine le chlorhydrate de pyocyanine et propose alors la formule brute suivante : $C_{60} H_{59} N_{10} Cl_5 O_3$, sont donc tous les deux à rejeter et la formule brute doit être définitivement : $C_{26} H_{20} N_4 O_2$. La *pyocyanine* se décompose à + 60°. Le poids moléculaire a été déterminé dans l'acide acétique cristallisable, dans lequel la base est facilement soluble en formant le sel acétique. Le poids moléculaire semble donc être 424. Le colorant est très peu résistant à l'action des réactifs oxydants, car le permanganate de potassium ou l'eau oxygénée détruisent la couleur en très peu de temps. La réduction s'effectue très facilement; on obtient une combinaison incolore, qui par agitation à l'air, redevient de nouveau bleue. Comme réactif réducteur on peut employer : le glucose ou l'hydrosulfite de sodium en solution alcaline. Par contact prolongé avec les acides dilués, la couleur de la *pyocyanine* se transforme en rouge vineux très prononcé. De cette solution rouge on ne peut plus extraire la substance chromogène au moyen du chloroforme. Il s'est formé un nouveau corps : l'*Hémipyocyanine*.

Les auteurs ont pu, de cette façon, en préparant le chloroaurate de l'hémipyocyanine, démontrer que la molécule de *pyocyanine* a une constitution symétrique et que sa dé-



Hémipyocyanine = Oxyphénacine

composition doit s'effectuer sans fixer d'eau. La formule brute de ce sel est $C^{12} H^{8} N^{2} O$. La *pyocyanine* a un caractère basique très net. L'*hémipyocyanine*, par contre, se comporte à la fois comme une base ou comme un acide, à peu près comme le phénol. Elle se dissout dans les acides minéraux avec une couleur rouge vineuse et dans les alcalis avec une coloration rouge violet. En neutralisant on obtient la précipitation de cristaux jaunes. Les auteurs ont ensuite pu réaliser la synthèse de l'*oxyphénacine* et ont pu démontrer l'identité de ce corps avec l'*hémipyocyanine*, dont la formule est donc définitivement : $C^{12} H^{8} N^{2} O$. Ainsi on a pour la première fois prouvé la production d'un dérivé des phénacines comme produit de désassimilation d'un organisme vivant. Par quels moyens les bactéries arrivent-elles à fabriquer cette combinaison relativement très complexe ? On n'a pu l'élucider jusqu'à présent. En partant de la *pyocyanine* naturelle on



Pyocyanine

peut isoler à peu près 80 % du poids de l'*hémipyocyanine* ou de l'α *oxyphénacine ;* théoriquement il doit se former 98 % de ce corps. Par ce fait il faut admettre, qu'il existe dans la *pyocyanine* ($C_{26} H_{20} N_4 O_2$) deux molécules de l'α *oxyphénacine* préformée. En partant de cette théorie les auteurs ont obtenu par la suite en chauffant l'α *oxyphénacine* avec le sulfate de méthyle une solution rouge, qui précipite par addition d'éther sec, un sel méthylo-sulfurique à cristaux brun-rouge, dont la formule a été établie : $C_{13} H_{11} N_2 O (SO_4 CH_3)$.

Si on dissout ces cristaux dans l'eau en présence d'alcali, il se forme un corps qui peut être extrait par le chloroforme. Cette substance est, d'après son aspect caractéristique, son point de fusion et les réactions analytiques, complètement identique à la *pyocyanine naturelle.* D'après ces recherches la formule de constitution de la *pyocyanine* est définitivement établie et correspond à : $C_{26} H_{20} N_4 O_2$.

Ce corps a donc ainsi été pour la première fois préparé synthétiquement et reconnu comme un dérivé de la *phénacine.* Il est par conséquent à classer dans le groupe chromogène des *indulines,* des *safranines* et des *indantrènes,* si bien étudiées récemment. Il n'est pas encore établi jusqu'à présent, par quel moyen la synthèse biologique de la pyocyanine s'effectue, parce qu'on a de grandes difficultés à suivre le chemin que le *Bacille pyocyanique* emploie pour construire, en partant de substances tellement dégradées comme l'acide lactique et de substances minérales, un corps d'une structure aussi complexe.

Enfin Wrede et Strack posent la question suivante : quel est le rôle incombant à ce colorant, qui absorbe et libère si facilement l'hydrogène, dans le processus vital de son générateur ou dans le métabolisme de l'hôte sur lequel la bactérie vit en parasite ? Quoiqu'il en soit, il est aujourd'hui démontré, que nous avons ici affaire à un pigment bactérien présentant des caractères spécifiques et qui est complètement différent du groupe des pigments du *Bacillus prodigiosus* et du *Bacillus chlororaphis* décrits antérieurement.

C. Les Anthocyanes

On donne le nom d'*anthocyanes* aux matières colorantes bleues, violettes ou rouges, que l'on rencontre chez les fleurs, beaucoup de fruits et dans nombre de feuilles. Ces matières

solubles dans l'eau ou dans l'alcool étendu, insolubles dans les solvants organiques, sont des *glucosides non azotés*, à spectre d'absorption caractéristique.

D'après Overton (92), l'apparition de la coloration rouge semble provenir d'un accroissement de la quantité des sucres contenus dans les tissus végétaux. Combes (93) a, en effet, vérifié que la production d'*anthocyane* correspond bien à une accumulation de sucres et de glucosides et à une diminution de la proportion des dextrines. La formation du pigment est favorisée par l'action lumineuse et par le contact des tissus avec une solution de saccharose. C'est ainsi que l'abaissement de la température, qui provoque la transformation de l'amidon en sucre, joue un rôle important dans le rougissement des feuilles à l'automne. D'après la plupart des auteurs ce rougissement serait corrélatif de la présence de l'oxygène, ainsi que de l'augmentation de l'intensité des phénomènes respiratoires. Cependant, Combes (94) a montré synthétiquement que l'anthocyane des feuilles rouges prend naissance, lorsque le composé correspondant, contenu dans les feuilles vertes, est soumis à des actions réductrices. Réciproquement, le même auteur a signalé ce fait, que le pigment jaune produit par les feuilles vertes de vigne vierge, pendant la période active de la végétation, peut être obtenu expérimentalement, en dehors de l'organisme, par l'oxydation du pigment rouge des feuilles d'automne. Dans des travaux très intéressants et approfondis sur ces substances colorées, Willstætter (95) et son école ont pu extraire les colorants, qu'ils ont obtenu à l'état de pureté et cristallisé. Les auteurs proposent de nommer ces glucosides : *Cyanines* ou *anthocyanines* et leur produit de dédoublement : *cyanidines* ou *anthocyanidines*. Les *anthocyanines* donnent lieu à une réaction très intéressante, qui permet de distinguer la substance glucosidique initiale de ces composants, prenant naissance par séparation du glucose. Cette réaction repose sur le partage des *anthocyanines* et des *anthocyanidines* entre l'eau acidulée et l'alcool amylique (Réaction d'Erdmann (96)). Les premières demeurent dans la couche aqueuse; les secondes passent totalement dans l'alcool amylique. Les *anthocyanes* peuvent exister sous une modification isomérique incolore.

Le colorant a été extrait des fleurs sèches par une extraction très rapide au moyen de l'eau ou d'une solution alcoolique très faible; dans ces conditions il ne subit pas de modifications

remarquables. On arrive encore plus facilement à isoler la substance colorée en ajoutant à l'eau de l'azotate de soude ou du chlorure de sodium; la présence de ces sels évite toute modification du colorant. De la solution aqueuse on précipite la *cyanine* au moyen de l'alcool et on purifie par précipitations fractionnées successives à l'aide de l'alcool et de l'eau. Par dialyse on peut alors obtenir une petite quantité de *cyanine* cristallisée. On a ainsi une combinaison de potassium; par précipitation à l'aide d'acide chlorhydrique, on sépare les impuretés qui restaient encore, surtout les pentosanes. Le sel chlorhydrique, que l'on obtient a la formule globale : $C^{28} H^{33} O^{17} Cl + 3 H^2 O$.

Par hydrolyse on obtient :

$$C^{18} H^{33} O^{17} Cl + 2 H^2 O = C^{16} H^{13} O^7 Cl + 2 C^6 H^{12} O^6.$$

Donc le composé chromogène proprement dit est composé de *cyanidine* et de deux molécules de glucose. Cette réaction, appelée réaction d'Erdmann, se fait de la façon suivante : quelques cristaux de chlorhydrate de *cyanine* sont dissous dans quelques centimètres cubes d'acide sulfurique normal. Cette solution acide, colorée en rouge, n'abandonne pas de trace de colorant à l'alcool amylique. Mais la même solution, traitée pendant 1/2 heure à 3/4 d'heure au bain-marie bouillant et agitée de nouveau avec de l'alcool amylique, est complètement décolorée et le colorant passe entièrement dans l'alcool amylique, en donnant à celui-ci une belle teinte rouge violacée.

Les auteurs ont ainsi pu démontrer qu'il existe un grand nombre d'*anthocyanines*, qui se distinguent par leur teinte initiale, leur solubilité et la réaction en présence du perchlorure de fer.

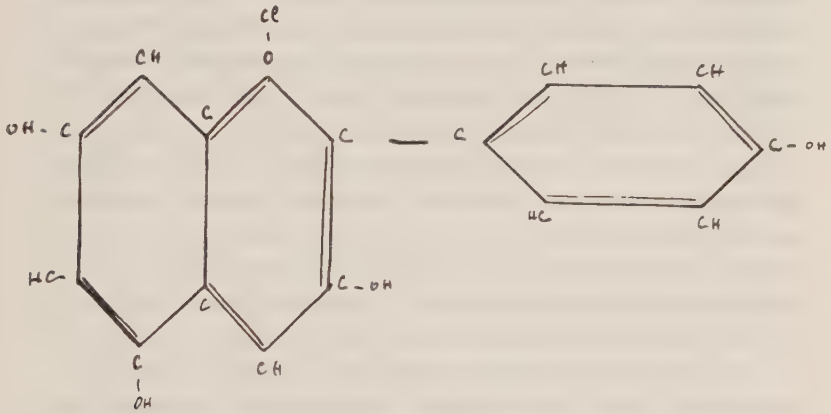
Nous donnons ici un petit schéma exprimant ces différences pour quelques *cyanines* et *cyanidines :*

Cyanine et Cyanidine	Pélargonine et Pélargonidine	Oenine et Oenidine	Delphinine et Delphinidine	
$C^{28} H^{33} O^{17} Cl$ $C^{15} H^{11} O^{6} Cl$	$C^{15} H^{11} O^{5} Cl$	$C^{17} H^{15} O^{7} Cl$	$C^{15} H^{11} O^{7} Cl$	Composition
Rouge	Rouge jaunâtre	Rouge-violet	Rouge-violet	Couleur de l'extrait acidifié
Bleu	Violet	Bleu	Bleu	Couleur de l'extrait après avoir ajouté du $CO^{3} Na^{2}$
Rouge-violet	Rouge	Rouge-violet-bleuâtre	Rouge-bleuâtre	Couleur de la couche amylique
Longues aiguilles	Prismes quadrangulaires et en forme de queue d'hirondelle	Prismes	Plaques	Cristallisation
Insol. dans $H^{2}O$ Diff. sol. dans les acides dilués	Sol. dans l'eau. Sol. à chaud dans H Cl, à froid diff. sol. dans H Cl et $SO^{4} H^{2}$	Insoluble dans l'eau. Diff. sol. dans H Cl	Facilement sol. dans H Cl dilué. Presque insol. dans $SO^{4} H^{2}$	Solubilité
Dans l'alcool bleu. Dans l'alcool dilué violet	Pas de réaction caractéristique	Pas de réaction caractéristique	Dans l'alcool bleu. Dans l'alcool dilué violet	Réaction avec $Fe Cl^{3}$

D'autre part, tandis que les *anthocyanes* à l'état de pureté se décolorent presque tous très vite à la température ordinaire, les *anthocyanidines* correspondantes sont très stables à froid et se décolorent sans exception seulement à la chaleur, parce que le dérivé *pyronique* à liaison quinoïde, se transforme en sel pyronique ordinaire. La couleur des *anthocyanidines* réapparaît aussi seulement par le chauffage sous l'action des sels minéraux. La constitution chimique et la formule développée des *anthocyanes* ont été définies par l'école de Willstætter (97) et ont été reconnues comme appartenant au groupe « *Flavylium* », ces derniers sont des dérivés du *Phenopyrylium phénolé* (Decker et Fellenberg (98)). D'autre part ces auteurs sont arrivés à préparer ces substances chromogènes synthétiquement. Zechmeister

(99) a ainsi obtenu la *pélargonidine* en combinant du *triméthoxycoumarine* avec du *para-bromanisol* et du *magnésium* en solution éthérée; il obtient ainsi d'abord un chlorure d'*Anisyltriméthoxypyrylium* et par des méthylations avec de l'*acide iodhydrique*, ce sel passe au chlorure de l'*oxyphényltrioxybenzopyrylium*, dont les propriétés et réactions sont tout à fait identiques à ceux de la *pélargonidine*.

Cette synthèse permet de fixer la constitution de ce corps : $C_{15} H_{11} O_5 Cl$.



On voit donc que ces colorants sont en parenté étroite avec les groupes des *flavones*. En chauffant avec des alcalis, la *pélargonidine* se décompose, en donnant de la *phloroglucine* et l'acide *protocatéchique ;* la *delphinidine* donne la *phloroglucine* et l'*acide gallique*. Il semble donc que la *phloroglucine* joue un rôle important dans la formation de ces substances colorantes des *anthocyanes* chez les végétaux. En effet, Czartkowsky (100), a pu démontrer expérimentalement, que de tous les phénols polyvalents, seule la phloroglucine augmentait la formation des colorants. En outre, la vitesse de la production des anthocyanes était en rapport direct avec la concentration des sucres dans les solutions.

Après avoir ainsi décrit les propriétés et réactions chimiques, la constitution et la synthèse des anthocyanes, nous tenons à rapporter ici dans un petit chapitre l'action du milieu ambiant, des constantes physiques de température, de lumière, etc. sur ces colorants. L'influence de ces facteurs sur la coloration des *anthocyanes* a été très bien étudiée par Portheim (101), qui a constaté les faits suivants :

A des températures basses on a observé les colorations rouges ou bleues les plus intenses. Très souvent il semble se produire aux températures les plus basses employées, une teinte rouge. Une température de + 15° a occasionné une décoloration plus ou moins forte, ou a produit d'autre part une coloration rouge.

Au cours de la préparation des extraits de plantes ou de fleurs par chauffage avec de l'eau distillée ou l'alcool à 75°, on constate qu'il s'établit des divergences de coloration quant à l'intensité et à la nuance de celle-ci. Ces phénomènes semblent en rapport avec la nature du solvant. Tous les extraits ont présenté une coloration rouge plus ou moins forte pendant l'ébullition. Après cette manipulation ils se sont comportés différemment :

a) dans des solutions aqueuses froides la teinte bleue, qu'on rencontre très souvent, peut masquer la coloration rouge;

b) d'autres extraits aqueux ne présentent pas de teinte bleue après le refroidissement. On note alors l'apparition d'une teinte jaune dans les solutions;

c) dans les extraits alcooliques bouillants le bleu existe et souvent avec une intensité plus marquée que dans les solutions aqueuses correspondantes. Si on refroidit alors ces liquides, l'intensité de la coloration diminue beaucoup et peut même disparaître complètement;

d) quelquefois aussi on constate dans les extraits alcooliques après refroidissement une teinte jaune ou brune.

Chez la plupart de ces solutions colorées, l'auteur a pu remarquer la réversibilité des réactions de coloration par le chauffage et le refroidissement. Dans tous les cas où les extraits aqueux présentaient une teinte bleuâtre, les températures basses occasionnaient l'augmentation du bleu; les températures hautes une diminution de la couleur.

Les hautes températures favorisent la coloration rouge, mais souvent il se produit un virage jaune. Dans quelques extraits la couleur bleue disparaissait à une température de + 25°, les autres se décoloraient déjà à une température inférieure. Quelquefois le rouge apparaît aussi aux températures les plus basses.

Dans les extraits alcooliques le bleu est détruit de même aux températures supérieures et les solutions prennent alors une teinte rougeâtre ou jaunâtre. L'intensité des colorations

des extraits alcooliques diminue en rapport direct avec la température et augmente de même proportionnellement. La résistance des extraits *anthocyaniques*, obtenus au moyen des organes colorés de différentes plantes en expérience, aux températures supérieures est très variable. A l'ébullition, dans l'eau distillée ou dans l'alcool à 75°, les fleurs d'un grand nombre de plantes se décolorent presque entièrement; par le séchage, les pétales se recolorent de nouveau et prennent une teinte qui est souvent très intense. Des bandes de papier-filtre imbibées à l'aide de ces solutions colorées, aqueuses ou alcooliques, changent de couleur, séchées à l'air ou à la flamme. Si on modifie brusquement le degré de température, à laquelle ces bandes sont exposées, on occasionne de fortes différences de coloration. La teinte bleue, la plus intense, a pu être constatée à la température de + 5° à + 20°, ensuite la teinte rouge apparaît progressivement. D'un autre côté l'auteur a chauffé des bandes de papier-filtre imprégnées d'*extraits anthocyaniques*, il les a porté dans la vapeur d'eau, dans des dessicateurs ou dans des chambres humides et chauffées de + 5 à + 40°. Il a ainsi pu démontrer que la coloration du papier-filtre imprégné était en rapport avec les variations de température et l'humidité de l'air. L'apparition d'une coloration rouge était favorisée par la diminution de l'état hygrométrique, celle de la teinte bleue par l'augmentation de celui-ci.

En général des températures hautes et la dessication d'un côté, les températures basses et l'humidité de l'autre, avaient une action analogue sur la couleur. Dans le premier cas, le développement de la teinte rouge, dans le deuxième, l'apparition d'une teinte bleue était favorisée. L'intensité de la coloration bleue était augmentée dans quelques expériences par les températures basses, par la lumière du jour ou l'ultra-violet. L'apparition du rouge était favorisée par les températures hautes, par l'obscurité ou par l'infra-rouge.

Nous avons tenu à décrire les résultats et les observations de Portheim, avec assez de précisions et de détails, car nous allons voir que les faits constatés par cet auteur, sont en parfait accord avec les constatations que nous avons pu faire lors de nos expériences avec notre bactérie, et le travail de Portheim nous servira comme élément de preuve pour les conclusions que nous avons pu émettre à la fin de notre exposé.

Dans les deux chapitres antérieurs nous avons pu démontrer que les bactéries produisent en général des substances chromogènes très complexes.

Il semble assez surprenant de trouver aussi chez ces êtres des espèces susceptibles d'engendrer des colorants assez simples, que nous avons l'habitude de trouver dans les végétaux supérieurs. C'est pour ces raisons que nous insistons ici encore sur des observations, faites avant nous au sujet de la production de pigment *anthocyanique* par des bactéries. Nous n'avons pu trouver que deux cas bien étudiés : celui de LEHMANN et REISS (74), et celui de REINER-MÜLLER (73). Afin de permettre la comparaison de ces observations antérieures avec nos résultats nous tenons à décrire ici d'une manière assez détaillée les expériences de REINER-MULLER, qui a recherché sur quels milieux de culture la coloration bleue apparaît :

« Les milieux ordinaires comme la gélose, la gélatine et le bouillon ne se colorent pas en bleu, même après addition de glycérine, de tyrosine et des différents sucres, que l'on emploie ordinairement pour examiner la fermentation des micro-organismes. Sur le sérum de LŒFFLER j'ai constaté une seule fois une très faible apparition d'une teinte bleu-grisâtre. Sur la cervelle de veau stérilisée le *bacterium coelicolor* produisait une belle coloration bleue. Sur le jaune d'œuf gélosé il se développait aussi avec une teinte bleue. Sur milieu de pomme de terre j'obtenais les plus belles et les plus riches teintes. La coloration bleue apparaît sur tous ces milieux, uniquement à des températures inférieures à + 30° et seulement dans des cultures aérées. A + 36° la bactérie détruit elle-même la substance chromogène. Je suppose que le bacille ne produit pas directement le colorant, mais qu'il sécrète une matière chromogène incolore, qui donne alors avec les substances des milieux nutritifs une combinaison bleue. »

PORTHEIM a constaté que la gélose amidonnée de pomme de terre était le milieu de choix pour la production du colorant. L'amidon de blé et l'Amylum solubile MERCK, fournissaient aussi de bons résultats. Les résultats étaient moins bons, si l'on employait des substances très voisines de l'amidon, telles que l'inuline, le glycogène, la dextrine et la gomme arabique ou les dérivés de ces corps comme le raffinose, le saccharose, le lactose, le maltose, la mannite, le glucose, le lévulose, le galactose, l'isodulcite et l'arabinose. C'est pour ces raisons que

Portheim propose le nom d'*amylocyanine* pour le colorant bactérien. L'*amylocyanine* semble seulement se dissoudre dans l'eau ou dans les solvants aqueux. L'addition à la solution aqueuse à parties égales de glycérine, d'alcool absolu, d'acétone, de chlorure de sodium jusqu'à saturation ne modifient en rien le colorant. L'extraction du colorant est impossible au moyen de l'éther, du chloroforme, du sulfure de carbone, de l'alcool amylique, de la benzine, de l'éther de pétrole, du toluène ou de l'essence de térébenthine. L'extrait évaporé n'a pas fourni à l'auteur le colorant à l'état de cristallisation. L'agitation en présence de charbon et la centrifugation ont permis de séparer le pigment du liquide. Le permanganate de potassium ou la craie absorbent de même le chromogène. La décoloration se produit par un chauffage à 100 °, par contre un chauffage de plusieurs heures à 60 ° reste sans influence sur la matière chromogène. Par addition d'eau oxygénée la solution est devenue limpide et incolore au bout de quelques heures. Par le vide à 20 mm. de mercure on n'a pas pu obtenir de décoloration. La solution de potasse normale ou la solution d'acide oxalique normale, ajoutée à parties égales à une solution de colorant, décolore celle-ci au bout de 24 heures. Une coloration rouge est réalisée par l'acidification, ceci instantanément par l'acide chlorhydrique, l'acide sulfurique, l'acide acétique, l'acide oxalique, citrique ou salicylique. En ajoutant des alcalis on peut produire un virage vers le vert. Par l'action prolongée des alcalis, la solution se décolore alors complètement et devient jaune clair. Des colorations rouges sont aussi produites par l'addition des substances suivantes : Alun de potasse, sulfate de calcium, sulfate de magnésie, sulfate de zinc, chlorure de strontium, chlorure de lithium, chlorure de magnésium, chlorure de manganèse, azotite de calcium, phosphate bicalcique, etc. et la couleur reste dans ces conditions très stable. La coloration verte apparaît par l'addition des alcalis et vire au rouge par acidification. Plus tard il se produit cependant toujours une décoloration complète. La coloration verte reste par contre très stable, en ajoutant à la solution colorée du chlorure de mercure, du sulfate de mercure, du nitrate de mercure, du borate de soude, du tartrate neutre de potassium ou de l'acétate de plomb tribasique. Les substances suivantes sont sans action sur la couleur bleue : chloroforme, éther, benzine, xylol, puis les sels ajoutés

jusqu'à saturation : chlorure de sodium, chlorure de baryum, iodure de potassium, chlorure de potassium, nitrate de strontium, acétate de potassium, acétate de plomb et thymol. Le colorant bleu ne peut pas être précipité sans modification. Le colorant peut être précipité en flocons verts par des sels de mercure et par l'acétate de plomb tribasique. Une précipitation rouge est obtenue par le chlorure de zinc et l'étain chloro-sodique.

Le colorant le plus voisin de l'*amylocyanine*, paraît être le bleu des plantes où l'*anthocyane* isolé des plantes supérieures. Au cours de notre travail nous avons l'occasion de revenir sur ces constatations et de comparer les propriétés du pigment du *Bacterium coelicolor* avec celles de *notre Bactérie*. Il semble de toute façon, sans aucun doute, que Reiner-Müller avait déjà affaire à une bactérie, produisant de l'*anthocyane*. Que cet auteur ait aussi isolé cet organisme vivant en symbiose avec des cryptogames inférieurs, ceci paraît d'autant plus intéressant que, comme nous allons le démontrer au cours de ce travail, nous nous sommes trouvés dans des conditions analogues et il semble qu'il existe un rapport entre cette symbiose de la Bactérie avec le champignon et la production de colorants.

Nous avons ainsi terminé l'exposé sur la production de pigments chez les Bactéries et nous croyons avoir rapporté l'essentiel de ce qui a été étudié à ce sujet. Nous joindrons encore à cette partie de notre thèse un chapitre sur les différentes méthodes d'isolement des colorants et sur les procédés physiques récents, servant à la caractérisation des substances colorées, pour aborder ensuite l'étude spécifique de notre bactérie et nos recherches personnelles.

CHAPITRE IV

ESSAIS D'ISOLEMENT DES PIGMENTS BACTÉRIENS EMPLOYÉS AU COURS DE NOS TRAVAUX

Méthodes chimiques et physiques de caractérisations des pigments bactériens

1) Méthode chimique modifiée de THUMM.

Ayant affaire à une bactérie chromopare, sécrétant ou produisant un pigment diffusible dans le milieu ambiant et soluble dans l'eau, nous avons tout d'abord pensé pouvoir isoler la substance colorée par des procédés chimiques, adaptés à la technique employée par THUMM (102).

100 gr. du milieu de culture colorés en rouge et filtrés, sont mélangés avec 200 cc. d'alcool à 96°. On laisse reposer pendant 12 heures, en agitant de temps en temps vivement. On obtient ainsi une précipitation des matières albuminoïdes. On filtre et le filtrat clair, fortement coloré, est évaporé à consistance sirupeuse au bain-marie à une température comprise entre +80° et +100°. On laisse encore reposer, afin que la précipitation d'autres substances organiques et la cristallisation de quelques sels minéraux s'effectue. On filtre sur un filtre mouillé au préalable. On obtient un liquide fortement coloré, auquel on ajoute avec précaution environ 100 cc. d'alcool; on laisse encore reposer pendant 12 heures et on filtre. Le filtrat (N° 1) renferme seulement des traces du pigment peu solubles dans l'alcool, puis des substances protéiques en petites quantités. Le succinate d'ammoniaque et l'asparagine s'y trouvent en totalité, ainsi qu'une grande partie des sels minéraux.

Le précipité resté sur le filtre se compose par contre presque complètement de la substance colorée, des protéines insolubles dans l'alcool et de quelques sels organiques. On le reprend avec un peu d'eau distillée et on filtre. On chasse par un chauffage prudent l'ammoniaque, qui se trouve dans le filtrat coloré et on concentre à consistance sirupeuse.

On précipite alors une deuxième fois le colorant par l'alcool. On le reprend après lavage à l'alcool par de l'eau et on précipite de cette solution au moyen d'une solution aqueuse de chaux (0.112 gr. CaO; 100 cc. H^2O) l'acide phosphorique à l'état de phosphate de chaux, l'acide sulfurique à l'état de sulfate de chaux et par cette opération la potasse est transformée en hydroxyde de potassium, qui reste dans la solution aqueuse. Le filtrat renferme par conséquent : le colorant, de l'hydroxyde de potassium, et des traces d'hydroxyde de chaux. La potasse est éliminée par concentration au B. M. et précipitation par l'alcool en excès; on obtient un précipité uniquement formé par le pigment et des traces de chaux. On reprend avec de l'eau et on transforme l'hydroxyde de chaux en carbonate de chaux, par passage d'un courant de gaz carbonique dans la solution, et on obtient après filtration une solution rouge renfermant uniquement le colorant. Par concentration et précipitation à l'alcool absolu celui-ci se dépose à l'état de poudre amorphe que l'on peut sécher et examiner.

Ce procédé nous a donné tout d'abord un moyen d'obtenir des traces du produit chromogène, mais on conçoit facilement que par toutes ces manipulations, le colorant a subi sûrement des modifications concernant ses propriétés physiques et chimiques. D'autre part ce procédé est très long; les évaporations au B. M., exécutées plus tard par nous dans le vide à 60 mm. de mercure, sont très délicates et difficiles. Aussi le résultat final est quantitativement si minime, qu'au commencement nous étions obligés d'employer 10 litres de milieu de culture pour obtenir quelques dixièmes de milligrammes de substance amorphe. Une cristallisation du colorant a été impossible à réaliser par ce procédé. C'est pour ces raisons, que nous avons plus tard essayé d'isoler notre colorant par des méthodes moins brutales et moins laborieuses.

2) Méthode chimique de GRIMBERT-LASSEUR.

Lasseur (103) a publié, en ce qui concerne cette question, une méthode indiquée par Grimbert, qui lui a souvent donné satisfaction et grâce à laquelle il a pu isoler les corps colorés produits par 17 formes bactériennes. Parmi ces substances, les unes n'avaient pu être obtenues par les

procédés d'extraction habituellement employés, les autres n'étaient extraits que péniblement ou dans des conditions défectueuses de rendement.

En raison de l'instabilité de notre colorant et de la difficulté de l'obtenir à l'état cristallisé, nous avons cru intéressant d'employer cette méthode. Nous tenons à la décrire ici, malgré qu'elle ne nous ait pas donné entière satisfaction; mais lors des manipulations elle nous a fourni des indices précieux, que nous mentionnerons au cours de notre exposé, et qui nous ont été fort utiles dans la détermination de la nature et des propriétés de notre substance colorée.

Technique

« 1° Des milieux de cultures colorés ont été filtrés rapidement et concentrés ensuite au quart de leur volume primitif sous la cloche à vide à la température de +40°, réalisés par chauffage au moyen d'ampoules électriques.

2° Le liquide concentré est ensuite saturé par le sulfate d'ammoniaque à la température de +40°.

3° La liqueur saturée est transvasée dans de grands tubes, munis d'un bouchon, percés d'un trou par lequel passe un mince tuyau permettant l'échange des gaz. Ces tubes sont placés au B. M. après avoir ajouté de l'acétone à parties égales.

4° Quand le B. M. et les liquides en expérience ont atteint +40° on retire les tubes du B. M. et on agite avec précaution pour obtenir une précipitation du sulfate d'ammoniaque. On laisse reposer pour faciliter la séparation des deux liquides.

6° Le solvant est décanté et filtré. On répète l'épuisement une ou plusieurs fois en utilisant les quantités d'acétone beaucoup plus faibles que dans le premier traitement.

7° Les liqueurs d'épuisement sont évaporées à basse pression, puis on purifie par l'action alternative de l'eau et de l'alcool à 96°.»

Mais comme LASSEUR l'indique, l'acétone seule ne donne souvent pas satisfaction. c'est pour cette raison que nous avons manipulé avec un mélange acétone-alcool à 2/1, et de même au moyen de l'alcool amylique, et en travaillant

dans ces conditions nous avons finalement pu réaliser l'isolement du colorant de notre milieu par une technique appropriée en tenant compte de la nature et des propriétés spéciales du pigment de notre bactérie.

3) Méthode physique de GOPPELSROEDER basée sur l'analyse capillaire.

Il convient de citer encore ici une méthode basée sur des *principes physiques*, permettant la séparation et la purification des pigments microbiens : *l'analyse capillaire mise au point pour la première fois* par GOPPELSRŒDER. (104)

Cette méthode, qui a déjà rendu de grands services, parce qu'elle permet tout d'abord de se rendre compte rapidement, si un pigment vert, violet, orange, etc. correspond à une ou plusieurs substances colorantes. De plus, par la séparation des bandes d'absorption des papiers capillaires employés, on peut facilement obtenir à l'état de pureté des colorants non cristallisables. On peut ainsi obtenir des pigments assez purs, pour faire des analyses spectroscopiques dans la partie visible du spectre et dans l'ultra-violet. Dans la pratique de l'analyse capillaire, on a en outre intérêt à utiliser les différences de vitesse d'ascension capillaire, mais il faut surtout s'efforcer de concentrer les colorants dans des bandes très étroites et aussi éloignées que possible les unes des autres. Les pigments étant généralement assez sensibles à l'action de l'air et de la lumière, il y a intérêt à effectuer l'analyse dans une atmosphère de gaz inerte ou de manipuler dans des conditions de température et d'humidité égales. Le rôle du solvant est très important, et il faut toujours faire des analyses témoin avec le solvant seul. La substance absorbante joue aussi un rôle capital, et il faut savoir l'adapter à chaque cas particulier. Dans les dernières années l'analyse capillaire a encore gagné beaucoup d'intérêt par suite de la combinaison de cette méthode avec la technique utilisant la propriété fluorescente d'une grande quantité de substances dans la lumière ultra-violette et surtout dans les rayons de Wood, rayons ultra-violets filtrés et nettement limités de 400 à 300 mμ, et dont la partie principale est située à 366 mμ.

Les principes de l'analyse capillaire ont par conséquent dû être normalisés et standarisés. C'est DANCKWORTT et PFAU (105) qui ont employé ces méthodes pour analyser la chlorophylle et des substances actives renfermées dans différents produits de pharmacie galénique, tels que teintures, extraits et alcaloïdes. Les principes et techniques sont les suivants :

Les auteurs emploient le papier-filtre comme absorbant; par l'ascension d'un liquide sur du papier-filtre deux phénomènes physiques interviennent :

1° La capillarité;

2° L'absorption.

Par suite de ces deux phénomènes, il se forme des zones constituées par différentes substances, qui de cette façon peuvent être séparées. Ceci a déjà été constaté par FRÉDÉRIC SCHŒNBEIN (106) en 1861. C'est lui aussi qui recommande cette méthode pour l'analyse qualitative des solutions colorées. Un de ses élèves GOPPELSROEDER a ensuite mis au point cette méthode et lui a donné le nom d'*analyse capillaire*. Dans la suite les auteurs suivants : KUNTZ, KRAUSE, STOHMANN (107), PLATZ (108) et d'autres ont encore perfectionné cette méthode. Dans la pratique on emploie du papier-filtre très pur; le meilleur est le papier-filtre N° 598 de SCHLEICHER et SCHULL. Il est nécessaire d'effectuer avec la même sorte de papier des expériences de comparaison, parce que la hauteur maxima de l'ascension dépend de la qualité du papier. On coupe le papier en bandes dans le sens de la longueur des fibres et en général il est recommandé d'employer des bandes de 2 cm. ½ de largeur, et de 30 cm. de longueur. Ces bandes sont alors suspendues au moyen d'une baguette de verre à l'embouchure du tube à essai ou d'un becher de hauteur et de largeur convenables, de façon que la bande trempe par sa partie inférieure de 2 cm. dans le liquide à examiner. On ferme alors hermétiquement les récipients et on expose le tout à des températures et à des conditions physiques égales. On note l'ascension par minute et l'ascension terminale; après 24 heures ces bandes sont finalement séchées, après avoir effectué les observations nécessaires et elles peuvent ainsi être conservées et servir de test. DANCKWORTT et PFAU ont ensuite combiné cette méthode avec l'examen de la fluorescence de la substance

à étudier dans les rayons ultra-violets en employant les rayons de Wood pour caractériser la présence de traces de chlorophylle dans des extraits de drogues ou de teintures.

Si on fait passer les bandes de papier-filtre imprégné à travers une couche d'éther sous la *lampe de quartz*, on constate par la présence de traces de chlorophylle une zone rouge intense due à cette substance. Ensuite la zone se décolore et la solution éthérée se colore en rouge. Reich et Haitinger (109) ont employé cette méthode pour différencier les vins des cidres. Ernst et Jentschitsch (110) l'ont employée pour l'analyse de drogue figurant dans la pharmacopée autrichienne. On peut donc facilement se rendre compte de l'importance de ces méthodes, qui combinées, peuvent d'un côté servir à séparer plusieurs substances, notamment des colorants, et de l'autre pour la caractérisation et l'analyse qualitative de ces produits. Mais on a de suite remarqué l'inconvénient de ces méthodes, car dans l'interprétation des phénomènes de fluorescence on est plus ou moins sujet à des erreurs subjectives.

Ces différents chercheurs essayent de distinguer les diverses couleurs de la fluorescence; mais on trouve toujours de grandes différences dans les résultats. Et c'est ainsi que le développement des recherches analytiques par les rayons de Wood ont bientôt conduits à un moyen de mesure quantitative. Si on veut analyser quantitativement la fluorescence se produisant avec les rayons de Wood, il faut tenir compte de la couleur de l'intensité lumineuse et éventuellement aussi de la déviation polarimétrique de la lumière réfléchie. Par conséquent, pour l'interprétation des couleurs et de l'intensité dans la lumière ultra-violette filtrée, on est forcément amené à employer la *spectrographie*, et dans ces recherches il faut d'ailleurs tenir compte de la concentration des solutions de l'expérience. Un grand pas en avant a été fait dans cette voie par les travaux de R. Fabre (111) et de ses élèves. On emploie à cet effet un *spectrophotomètre*. Si on examine l'intensité spectrale de la fluorescence d'une substance à une concentration donnée, on obtient une série de courbes. Il semblerait qu'on puisse mettre en rapport direct ces courbes avec la teneur de ces solutions à matière fluorescente. Mais l'intensité de la fluorescence n'est cependant pas proportionnelle à la concentration de solution. Il existe par

contre une concentration optima pour laquelle l'action de la fluorescence atteint un maximum. Par conséquent 2 solutions d'une concentration différente doivent avoir une courbe de fluorescence identique, dont les ordonnées sont égales et les abscisses équidistantes de l'optimum.

Si on a déterminé la courbe d'une solution à examiner et si on répète la même opération avec une solution diluée de moitié, on peut facilement se rendre compte du point maxima, et on peut exactement déterminer la concentration de la solution. Partant de ce principe BAYLE, FABRE et GEORGE (112) ont déterminé les courbes et les dilutions optimas pour l'*hydrastinine*, la *quinine*, la *fluorescéine*, la *narcotine*, la *vératrine*, la *cotarnine*, la *papavérine*, etc.; l'intensité de la fluorescence a toujours été exprimée en chiffres par comparaison avec le *salicylate de soude*; pour celui-ci l'unité a été fixée à 20. ANDANT (113) de même emploie la *spectroscopie* et la *fluorescence* combinée pour la détermination des alcaloïdes pulvérulents. Son travail, très intéressant, se différencie des autres par l'emploi de différentes zones de rayons pour les radiations, par exemple : 3650, 3130, 2537 Å. Il obtient ainsi, en partant d'un même alcaloïde, différentes courbes et peut, par ce moyen, distinguer des alcaloïdes qui présentent pour une irradiation définie des courbes identiques. De cette façon la *théobromine* par exemple est moins fluorescente que la *caféine*, si la longueur d'onde des rayons énergétiques diminue.

Nous avons tenu à insister ici assez longuement sur les travaux de ces auteurs, puisque nous voulons attirer l'attention sur le profit que l'on peut tirer de la pratique analytique physique en général et dans l'étude des pigments en particulier, par l'emploi des phénomènes de fluorescence; ainsi ces travaux ont apporté des résultats très intéressants pour l'industrie des colorants, la toxicologie pharmaceutique et les recherches physiologiques et criminelles.

Nous voyons que par la combinaison de l'*analyse capillaire*, de la *fluorescence* et de la *spectrophotométrie*, on obtient par voie physique avec une grande facilité, un aperçu exact sur la composition et la structure d'un grand nombre de substances qui, par voie chimique, ne sont que très difficilement analysables, étant données les quantités minimes, dont on dispose ou bien la sensibilité vis-à-vis des réactifs chimiques, ou encore par la complexité de leur structure.

Nous avons par conséquent beaucoup regretté, que par suite des difficultés financières existant dans nos laboratoires, nos recherches sur ce terrain ont été très limitées. Car l'acquisition des appareils spectrophotométriques, dont se servaient BAYLE, FABRE, GEORGE et ANDANT, nous était impossible.

Nous étions par conséquent plus ou moins contraints d'expérimenter et d'analyser notre pigment par les méthodes chimiques.

Nous avons réussi néanmoins à caractériser et à classer notre pigment et nous nous réservons de compléter dans un travail ultérieur cette lacune en ce qui concerne les méthodes physiques.

Nous nous excusons auprès du lecteur d'être très bref dans l'*examen physique* du pigment du *Bacillus Citrulli* SARTORYI.

DEUXIÈME PARTIE

ÉTUDE MORPHOLOGIQUE ET BIOLOGIQUE DU BACILLUS CITRULLI SARTORYI SES CARACTÈRES CULTURAUX ET BIOCHIMIQUES.

CHAPITRE I

ÉTUDE MORPHOLOGIQUE

1) Origine.

Le bacille, qui fait l'objet de ce travail a été isolé pour la première fois par notre cher maître, le professeur A. SARTORY.

Il a été trouvé lors d'une exposition de produits agricoles sur des melons, en association avec un *Fusarium.*

Depuis lors nous avons eu nous même l'occasion d'observer plusieurs fois dans les *Halles de Paris,* les symptômes caractéristiques de cette maladie des fruits de *Cucurbitacées* et notamment sur le *melon,* le *potiron (Cucurbita maxima),* la *courge (Lagenaria vulgaris),* la *pastèque (Citrullus vulgaris),* et la *citrouille (cucurbita pepo) ;* dans chaque cas examiné avec grand soin nous avons pu trouver l'agent secondaire de cette maladie, qui est une *bactérie,* et que nous appellerons d'ores et déjà : *Bacillus Citrulli* SARTORYI.

Les symptômes de cette maladie des melons sont les suivants : on verra tout d'abord sur des fruits de courge musquée de Marseille, par exemple, envoyés ordinairement au marché avant maturité, et restés pendant 4 ou 5 jours dans des caisses entassées, se former ça et là de toutes petites boursouflures, pas plus grandes qu'un petit point à coloration jaunâtre.

Ces petites taches grossissent alors très vite sans que les fruits perdent leur forme ou qu'ils deviennent mous. La membrane prend alors une teinte ocreuse ou rouge-cinabre, mais elle garde toujours une consistance ferme et compacte, de sorte qu'on peut trouver ainsi des fruits jetés par des jardiniers, qui ont presque la moitié de la circonférence recouverte de cette couche rugueuse et chagrinée, sans que la courge devienne molle au toucher ou que sa forme extérieure subisse un changement appréciable.

A un stade un peu plus avancé la courge éclate alors subitement avec un bruit facilement perceptible. Cette explosion est certainement due à une forte proportion de gaz d'anhydride carbonique, qui s'emmagasine pendant l'évolution de la maladie (l'échange gazeux étant impossible à travers la membrane durcie et sclérifiée) et occasionnant ainsi l'éclatement du fruit.

L'intérieur du fruit est à ce moment mou, pituiteux, à l'état d'un premier stade de putréfaction. L'enduit glaireux prélevé sur les parties périphériques, beaucoup moins altérées que les couches profondes, permet alors de se procurer facilement les agents de cette maladie.

Ceux-ci sont toujours au moins au nombre de deux : un *champignon*, agent primaire de la maladie des courges, puisqu'il est le parasite cellulolytique ou au moins dissolvant des couches cellulosiques de la membrane du fruit, ouvrant ainsi une porte d'entrée à la *bactérie*, qui ne tarde pas à infecter les courges et qui devient alors le parasite essentiel, amenant la destruction et la putréfaction des tissus profonds des fruits. Ces faits ont déjà été démontrés par les travaux antérieurs de A. et R. Sartory et J. Meyer (114) et nous allons revenir ultérieurement sur ces phénomènes.

Toujours est-il que le symptôme de cette maladie et les agents isolés sont très spécifiques et ne peuvent être confondus avec d'autres infections de quelques *Cucumis* et autres *Cucurbitacées* étudiées si magistralement par J. Dufrenoy (115).

Le premier stade de notre maladie pourrait en effet être comparé à une affection assez commune du *melon*, caractérisée par des taches assez profondes du fruit, qui porte aussi extérieurement à la surface de petites masses d'un rose carné. C'est la maladie de la « *Nuille du melon* », causée par le *Colletotrichum oligochaetum*. Mais ces masses

deviennent vite gélatineuses et l'infection n'est pas limitée au fruit, elle s'attaque aussi aux feuilles et aux tiges de la plante, formant des taches brunes s'amollissant et pourrissant, de sorte qu'ordinairement les fruits n'atteignent plus un développement normal, restent petits et déjà pour ces raisons manquent de valeur marchande, et ne peuvent être confondus avec les fruits que nous avons examinés et qui ordinairement présentent des échantillons superbes et souvent même géants.

Une autre *anthracnose* s'attaquant le plus souvent aux fruits adultes peut être observée sur les *melons*, les *concombres* et les *courges*, occasionnée par le *Scolecotrichum melophthorium*. Ici les fruits portent d'abord des taches où les tissus se décolorent, puis brunissent, mais les endroits atteints deviennent vite mous et pourrissent. Ultérieurement il se développe à la surface des moisissures verdâtres constituées par des filaments et des conidies ovales allongées et de couleur verdâtre.

Si donc notre maladie ne peut pas être comparée avec les *mycoses* pures, elle ne peut pas non plus être classée dans le groupe des maladies de nature *bactérienne* proprement dites.

Prunet en 1924 et Nicolas et Aggery (116) en 1929, ont décrit une affection semblable :

La maladie consiste dans l'apparition sur les feuilles de taches jeunes qui s'étendent progressivement et se dessèchent; la feuille se déchire finalement. Les feuilles jeunes, formées postérieurement à la production des symptômes précédents, restent petites,déformées, crispées et très cassantes. La plante se développe mal, ne fructifie pas ou ne donne que des fruits sans valeur. Quant à la bactérie isolée de ces plantes malades, les auteurs en donnent la description suivante :

Les bactéries isolées du *melon* et du *cornichon* ne prennent pas le Gram et se colorent facilement au violet de gentiane; elles liquéfient la gélatine et provoquent un verdissement intense du cœur de l'artichaut; elles forment principalement des colonies blanches et quelques colonies jaunes.

Morphologiquement elles appartiennent aux *Coccacées*, les unes très petites, ovoïdes, longues de 0,7 à 0,8 μ ; les autres ovoïdes, mais groupées en chapelet de 4 cellules au

maximum : longueur 3 μ. Comme nous allons le voir ultérieurement, l'agent de l'affection bactérienne, décrite par Nicolas et Aggery n'a aucun rapport avec le bacille qui fait l'objet de notre travail.

Doolittle (117) a signalé d'autre part, en *Amérique*, une « *mosaïque* » de diverses *Cucurbitacées :* courge, potiron, melon et concombre.

Cette maladie est d'abord caractérisée par l'apparition sur les feuilles jeunes de taches vert-jaunâtres; quelquefois les feuilles sont boursouflées, épaisses, ayant l'apparence de cloques. Les plus âgées jaunissent d'abord le long de la nervure principale à partir de la base, puis se dessèchent au bout de 20 jours environ. Les fruits peuvent aussi être attaqués et présentent les mêmes taches que les feuilles; les régions jaunes cessent de s'accroître, tandis que celles qui sont vertes, continuent à se développer; le concombre ou le melon présentent alors un aspect verruqueux. La « *mosaïque* » serait une maladie de virus, car on n'y a découvert ni champignon ni bactérie. La mosaïque se transmettrait d'année en année par les graines, à moins que les plantes sauvages *(Phytolacca, Asclepias)* n'hébergent le virus pendant l'hiver.

La maladie que nous avons étudiée ne présente donc aucun des caractères spécifiques mentionnés dans les descriptions énumérées ci-dessus et que nous avons pu trouver dans la littérature de phytopathologie.

Nous allons maintenant décrire l'agent de cette affection, ainsi que les causes d'infection.

Des prélèvements effectués sur de nombreux échantillons de diverses *Cucurbitacées*, atteints de la maladie à tous les stades de l'évolution, du petit point jaune, lésant à peine la cuticule du fruit jusqu'au stade de l'éclatement de celui-ci, nous ont toujours permis, comme nous venons déjà de le mentionner, de constater au moins deux germes dans les lésions. Cependant, il nous a été donné d'isoler sur quatre melons très mûrs la bactérie seule. Cette bactérie, obtenue dans les cultures de différents prélèvements était constamment identifiable et présentait dans tous les cas des propriétés et des caractères analogues. Tandis que les autres organismes, que nous avons pu cultiver et isoler dans les prélèvements phytopathologiques, variaient très souvent.

Ainsi par la culture sur milieu acide, nous avons pu séparer de la flore bactérienne deux *Fusarium*, un *Verticilium*, des *Mucorinées*, le *Cladosporium herbarum*, et des *Aspergillacées*.

Dans la plus grande partie des cas cependant, et surtout exception faite des 4 cas mentionnés plus haut, nous avons pu trouver la présence d'un *Fusarium*, quelquefois encore accompagné d'un *Verticilium*.

Nous revenons sur l'importance de ces derniers organismes un peu plus loin. La bactérie, étant toujours présente, et dans quatre cas étant le seul agent pathologique ayant pu être constaté, semble donc être le seul organisme produisant la maladie des fruits de *Cucurbitacées*, que nous venons d'étudier.

Etude morphologique du Bacillus Citrulli SARTORYI.

Le *Bacillus Citrulli* SARTORYI présente, examiné en culture pure, les caractères des *Schizomycètes*, tels que VUILLEMIN (118) les définit. A l'état vivant, soit à l'ultra-microscope sur fond noir, soit en goutte pendante à l'aide de la boîte de culture de BORREL, cultivé à + 22° et examiné 24 ou 48 heures après l'ensemencement, la bactérie se trouve sur tous les milieux favorables, à l'état de bâtonnets droits ou légèrement arqués, les pôles opposés étant le plus souvent arrondis. Ces extrémités paraissent renflées en massue, de sorte que les deux parois de la membrane ne sont pas parallèles; la partie moyenne du plastide est généralement un peu étranglée, tandis que les extrémités présentent un diamètre un peu supérieur à celui du centre bactérien. Ainsi sur le fond noir l'organisme prend souvent l'aspect d'haltère. Ceci devient encore plus apparent par la présence de nombreux cils péritriches, qui cependant, à l'ultra-microscope, semblent seulement mobiles et en mouvement perpétuel sur les deux extrémités et simulent alors l'aspect de deux éventails réfringents polaires.

Très souvent chaque plastide bactérien est isolé et complètement libre, dans d'autres cas on trouve des formes diplo-bacillaires, qui dominent, rappelant fortement l'aspect du *pneumo-bacille* de FRIEDLÆNDER; d'autant plus qu'à certains moments ces formes d'évolution semblent complètement amobiles et entourées d'une gaîne. Les deux éléments du diplo-bacille peuvent être de taille inégale, l'un plus

grand est alors muni de cils, traînant l'autre à travers le champ microscopique, faisant l'impression d'un disque de sémaphore. Par fixation à l'acide osmique et coloration à *l'hématoxyline* d'une part ou par coloration vitale au *bleu polychrome* de l'autre, on constate que la première ébauche de la division s'effectue ainsi et que nous avons affaire dans ces formes avec des stades de scicciparité. On observe entre les deux éléments la formation d'une sorte d'anneau, si bien que durant le développement de l'élément jeune, il s'établit une liaison protoplasmique très nette entre les deux plastides et qui persiste quelque temps. Plus tard cependant cet isthme de nature protoplasmique semble disparaître complètement; une fois que les 2 corps du diplo-bacille sont de taille à peu près égale, on aperçoit encore un mince pont coloré, mais celui-ci ne paraît formé que par l'unité de la membrane. Cette zone de séparation peut être accrue par la présence de condensation mucilagineuse, formant une gaîne protectrice. On trouve dans ces préparations tous les intermédiaires entre les bâtonnets isolés et les plastides bactériens réunis.

De grands bâtonnets, chez lesquels l'énergie de croissance l'emporte sur l'énergie de division, même sur les milieux les plus favorables, sont très rares. (Fig. V).

Mais sur notre milieu synthétique liquide, qui nous a pendant nos expériences toujours donné les meilleurs résultats et qui semble être un milieu de choix pour l'organisme en étude, tant pour la croissance que pour le métabolisme de l'assimilation et de la désassimilation, nous avons toujours obtenu un voile très compact à la surface du milieu. Ce voile à l'état jeune, âgé de 48 à 72 heures, est presque toujours constitué par des éléments bactériens en chaînettes plus ou moins longues, formées d'éléments ronds ou allongés au nombre de 6 à 12 et même jusqu'à 15. Ces chaînes rectilignes ou sinueuses sont toujours simples et nous n'avons jamais pu observer de formes ramifiées. Les cultures ont été spécialement effectuées sur des milieux d'œuf ou sur des milieux additionnés de *caféine*, de sels de *lithine* (119) ou sur milieu sérum-peptone-glycérine (120), afin de produire des formes d'involution de notre bactérie; mais tous nos essais sont restés infructueux.

Dans les cultures anciennes en général et dans des milieux liquides très sucrés, où le bacille forme très tôt un dépôt abondant dans la profondeur du tube de culture, on observe

aussi à côté des formes en bâtonnets, des formes très courtes, très plasmolysées, mais le plus souvent on trouve dans ces conditions des formes rondes ou légèrement ovoïdes. Ici alors l'aspect de diplocoque ou aussi de tétrades domine. Ces diplocoques observés à l'ultra-microscope et sur fond noir (solution à l'encre de Chine, ou au collargol) rappellent encore plus les formes et propriétés *pneumo-bacillaires*. (Fig. VI et VIII).

Vous voyons par conséquent que le *Bacillus Citrulli* SARTORYI pourrait être qualifié de polymorphe; mais en réalité, la bactérie, une fois ses propriétés fixées et adaptées à un milieu spécifique et favorable quelconque, offre toujours un ensemble homogène et ces caractères morphologiques évoluent dans un sens consécutif, produisant des formes d'involution, qui sont toujours superposables et plus ou moins homogènes.

2) **Mobilité.**

Le mouvement propre du *Bacillus Citrulli* SARTORYI a été étudié dans des conditions nettement définies.

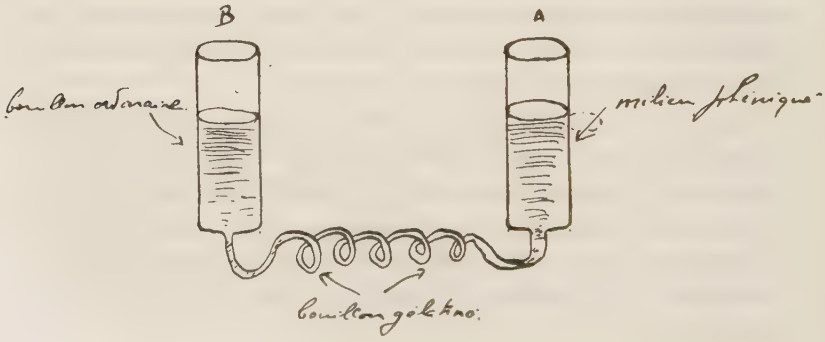
Des cultures ont tout d'abord été effectuées dans la boîte de culture de BORREL, sur des milieux liquides, tels que bouillon de viande, eau peptonée et milieu synthétique F. Ces cultures ont été placées soit à 37° soit à 27° soit à 18°, et ont été examinées sur la platine chauffante aux mêmes températures soit sans coloration, soit à l'aide d'une coloration vitale, au moyen de solutions à 0,05 % de violet de *Dahlia* ou de *vert-malachite* (W. Albach (121). Les milieux de culture ont été ajustés au moment de l'ensemencement à 2 concentrations en ions H différentes, l'une était de pH = 6,4, l'autre était de pH = 7,6. Dans les deux cas les bactéries examinées microscopiquement après une culture de 8, 24, 48 heures et 4, 8, et 15 jours, présentaient des mouvements de translation et de rotation très nets.

En ajoutant à des cultures identiques, soit une solution de sublimé à 10 %, soit d'acide phénique à 5 %, nous avons pu constater un arrêt brusque de la mobilité de nos cultures. Nous nous trouvons donc en présence d'oscillations dues au mouvement propre des plastides et non à un mouvement brownien, ou à un déplacement par suite de courants du milieu liquide.

Une autre expérience plus intéressante et fournissant une preuve plus probante de la mobilité propre de notre organisme a été effectuée à l'aide d'un dispositif décrit par Nepveux (122). Un tube en verre est chauffé dans sa partie moyenne, puis étiré finement à la lampe à environ 1 millimètre de diamètre. En étirant on enroule cette partie autour d'un charbon de Berzelius, afin d'obtenir un tube en serpentin, dont les deux extrémités à diamètre initial sont en position verticale.

On introduit dans la partie profonde et enroulée un bouillon gélatiné à 6%, donc présentant une viscosité assez prononcée; on bouche les 2 orifices des deux extrémités larges du tube avec du coton cardé et on stérilise le tout à l'autoclave à 120°. Après refroidissement on introduit stérilement et avec précaution sans agiter dans une des branches verticales un bouillon phéniqué à 1 °/oo, dans l'autre branche du bouillon ordinaire. On ensemence le bouillon phéniqué avec une petite ose de culture et on place, sans agiter, le tube à + 22°. Il se forme alors dès le lendemain, un trouble dans le bouillon ordinaire, qui augmente très vite, tandis que le développement devient seulement apparent 48 heures plus tard, dans la branche renfermant le bouillon phéniqué, ensemencé cependant initialement.

Par conséquent, par suite d'un chimiotactisme négatif vis-à-vis de l'acide phénique, le *Bacillus Citrulli* Sartoryi, à l'aide de sa mobilité propre, a réussi dans un temps inférieur à 24 heures à traverser le liquide gélatiné d'une consistance visqueuse très marquée, et sur une distance d'environ 40 centimètres. De ce fait nous nous croyons en droit de conclure que notre bactérie possède une mobilité très remarquable.



L'existence de cette mobilité parait déjà indiquer que notre bacille possède des cils ou des fouets.

Afin de caractériser l'existence de ces organes nous avons procédé aux expériences suivantes :

Nous avons tout d'abord utilisé dans ce but des cultures très jeunes sur gélose, milieu classique pour la caractérisation des cils bactériens, qu'on emploie surtout pour le groupe *coli-typhique*. Les cultures ont été placées à + 37° et + 22°. Des frottis ont été préparés avec soin et à plusieurs reprises; nous n'avons cependant pas réussi, soit par la méthode de Van Ermengem, modifiée par Lasseur, soit par la méthode à l'encre de fuchsine de Nicolle et Morax, à mettre en évidence des images, qui pouvaient être considérées incontestablement comme des cils. De nouveaux essais ont été nécessaires pour la caractérisation des organes locomoteurs, qui du moment que le bacille semblait certainement mobile, devaient probablement exister.

Des cultures effectuées dans des boîtes de Borrel sur des milieux liquides, dans les conditions qui nous ont déjà servies pour examiner la mobilité du bacille, nous ont ici aussi donné satisfaction. En ajoutant à la culture en goutte pendante, et avec précaution, une goutte d'une solution à 5 % de *collargol*, on constate facilement sur le fond rouge brun ainsi créé, la présence de *nombreux cils péritriches*.

La méthode de Burri à l'encre de Chine, en employant de même les lames couvre-objets des cultures en boîte de Borrel, nous a donné le même résultat et nous ont confirmé nos constatations antérieures, obtenues au moyen de l'éclairage sur fond noir.

En effet, ces différentes techniques nous ont permis d'observer que le *Bacillus Citrulli* Sartoryi a des cils péritriches très abondants, mais comme nous venons déjà de le mentionner, ils sont seulement libres et en parfait état de développement et de fonctionnement sur les deux extrémités du grand axe du bâtonnet, formant un bouquet en forme de gouvernail à chaque pôle, tandis qu'au centre ces cils semblent réunis et agglomérés les uns aux autres par une masse mucilagineuse, qui à un certain stade de l'évolution du bacille devient très abondante, et ceci surtout sur les milieux solides ou en culture âgée; à ce moment on a beaucoup de difficultés pour mettre en évidence les cils locomoteurs, qui cependant

doivent exister, car même en forme diplococcique ou coccobacillaire, l'organisme présente, encore observé à l'ultramicroscope, des mouvements de translation propre et individuel.

Cette sécrétion mucilagineuse devient cependant, sous certaines conditions culturales, tellement intense, que nous avons eu souvent l'impression de l'existence de véritables capsules entourant le plastide, comme on a l'habitude de voir le *pneumocoque* ou le *pneumobacille* dans des prélèvements pathologiques.

Afin de mettre au point cette question, nous avons cultivé notre bactérie tout d'abord sur différents milieux. Nous avons déjà vu que sur des substances solides ce phénomène devenait beaucoup plus marqué; mais sur un milieu complexe à base de gélose (2 %) — glycérine (3 %) — glucose (2 %) — succinate d'ammoniaque (2 %) — craie (trace), nous avons obtenu des résultats nettement favorables, de sorte que la zone hyaline brillante, entourant le corps bactérien, avait souvent plus de 2 fois la largeur du bacille même. Sur sérum de cheval on obtenait le plus souvent des éléments diplococciques avec une sorte de capsule très belle aussi.

Mais en réalité il ne s'agit pas ici d'une capsule dans le sens strict du mot, il s'agit d'une sécrétion mucilagineuse plus ou moins épaisse, difficilement colorable, faiblement réfringente, due à des phénomènes physiques tels que Gamaleia (123) l'a déjà observé (humidité, pression osmotique etc.). Ceci a été mis en évidence par les techniques suivantes indiquées par Lasseur.

Technique à l'encre de Chine.

Celle-ci est étendue de deux fois son volume d'eau distillée, portée à l'autoclave à 120° pendant 20 minutes pour faciliter la précipitation, et centrifugée jusqu'à ce que l'on obtienne un dépôt appréciable. On décante, on porte dans des tubes effilés et on abandonne au repos pendant trois à quatre semaines. Puis on décante de nouveau. Cette encre est alors préalablement diluée avec de l'eau distillée en quantité suffisante pour que le liquide obtenu donne avec le matériel cultural, une émulsion réalisant un fond sombre. On voit alors au microscope le corps bactérien du *Bacillus Citrulli* Sartoryi très brillant et illuminé, tandis

que la couche mucilagineuse environnante est légèrement éclairée, fournissant une zone hyaline faible. Des préparations témoin effectuées avec un prélèvement de *pneumocoque*, ont nettement démontré la différence de la nature de ces enveloppes bactériennes.

Technique au Formol-Fuchsine :

Le procédé de *formol-fuchsine* au *tanin*, indiqué également par LASSEUR, nous a donné la même différence entre la capsule du *pneumocoque* et l'auréole mucilagineuse du *bacillus citrulli*.

Le mode opératoire de ce procédé est le suivant : On fait une émulsion avec une culture bactérienne et son volume de sérum de cheval au quart. On fixe cette émulsion à l'aide du fixateur de BOUIN. On lave à l'eau et à l'alcool; puis on fait agir pendant deux minutes une solution de tanin à 15 %. On colore au violet de gentiane à chaud, on fait agir le liquide de LUGOL, on décolore au moyen de l'alcool. Puis on colore la préparation pendant 10 minutes avec une solution potassique de fuchsine au tanin.

L'auréole autour de la bactérie, très développée pendant le stade coccobacillaire et peu visible à l'état de bâtonnet, n'est donc qu'une partie de la membrane bactérienne qui cependant apparaît dans tous les stades de l'évolution et qui chez la bactérie, très mobile, est limitée à la zone moyenne du corps, donnant alors à celui-ci la forme d'haltères.

3) **Coloration.**

Le *Bacillus Citrulli* SARTORYI se colore facilement avec les colorants basiques d'aniline, employés ordinairement dans les laboratoires.

Il se décolore très rapidement (trois secondes dans l'alcool) par la méthode de GRAM, il est donc strictement à Gram *négatif*.

La méthode de coloration de CLAUDIUS, donne le même résultat que la méthode de GRAM. Par la confection du frottis, le bâtonnet prend ordinairement une forme incurvée à extrémités arrondies, souvent la partie moyenne du corps du plastide est moins colorée et moins réfringente, tandis que les deux pôles sont très avides de colorant. Il semble

donc qu'il y a condensation cytoplasmique, en forme de croissant ou de demi-sphères, au niveau des deux pôles. Dans la partie réfringente très remarquable chez les jeunes cultures, nous avons aussi pu observer ces corpuscules ronds, incolores, que nous avons réussi à caractériser par des colorations au *Soudan* III et le *triméthylamidoazobenzol*, communs des globules graisseux.

Dans les éléments coccobacillaires, ces phénomènes ne peuvent pas être observés; ici le plastide bactérien se colore très uniformément et d'une façon homogène. Les corpuscules métachromatiques du glycogène et des chromatophores ou des autres organes différenciés n'ont pas pu être observés. La membrane est toujours très mince, elle est chromophile et se distingue nettement des couches hyalines mucilagineuses environnantes.

Sur tous les milieux employés nous avons essayé de caractériser des formes de résistance ou conservatrices spécifiques. Mais jamais nous n'avons, par des examens directs ou par des colorations spéciales (procédé à l'acide chromique ou double coloration par la fuchsine de Ziehl à chaud) pu trouver des endospores typiques. Le *Bacillus Citrulli* Sartoryi ne produit donc pas de spores. Ces propriétés d'introduction vers des formes cocciques et la capacité de s'entourer d'une gaîne mucilagineuse lui fournissant d'ailleurs des moyens de protection, largement suffisants, comme nous allons le constater dans le chapitre des propriétés biologiques.

4) **Dimensions.**

Nous avons déjà vu qu'il n'y a pas de milieu où les dimensions du *Bacillus Citrulli* soient constantes et permanentes. Ses mesures sont très variables, à cause de l'involution constante de la bactérie. Certaines formes dans des liquides peu concentrés sont très frêles, d'autres dans des milieux à concentration plus forte se gonflent souvent du double de leur taille habituelle, sans changer pourtant sensiblement d'aspect général.

Nous avons évité par principe de donner au commencement de ce chapitre des dimensions, car nous savons que ces mesures sont tout à fait relatives et que les dimensions des germes sont variables, selon qu'on examine ceux-ci à l'état

frais ou après dessication, fixation et coloration. Etant donné les variations suivant le mode d'examen, nous avons donné dans le tableau suivant quelques mesures en indiquant les conditions dans lesquelles elles ont été effectuées. Les mesures sur le tableau ci-contre ont toutes été faites à l'aide de cultures âgées de 4 jours.

Milieu	État frais				État de fixation			
	Corps Bacillaire		Plastide + cils		Procédé à l'encre de Chine		Coloration simple	
	Min.	Max.	Min.	Max.	Min	Max.	Min.	Max.
Bouillon de viande	0,46	2,85	0,52	4,00	0,50	3,55	0,41	2,75
	0,3	0,46	0,32	0,53	0,26	0,51	0,28	0,45
Bouillon glycériné	0,5	3,5	0,63	4,2	0,58	3,75	0,44	3,00
	0,3	0,5	0,32	0,66	0,28	0,61	0,3	0,5
Bouillon glyc. gélosé.....	0,55	0,9	0,55	0,9	0,68	0,81	0,55	0,92
	0,45	0,8	0,45	0,8	0,62	0,81	0,43	0,82
Milieu synth. F. pH = 6,4.	0,42	0,99	0,42	0,99	0,4	1,2	0,3	0,85
	0,28	0,62	0,28	0,62	0,28	0,88	0,25	0,88
Milieu synth. F. pH = 7,6.	0,5	3,7	0,52	4,5	0,52	4,2	0,35	3,7
	0,3	0,5	0,3	0,67	0,3	0,67	0,28	0,52
Milieu végétal de melon ..	0,4	0,93	0,4	0,93	0,4	1,00	0,3	0,85
	0,27	0,74	0,27	0,75	0,28	1,00	0,3	0,85

Nous pouvons par conséquent tirer de ce tableau à peu près les conclusions suivantes :

Le *Bacillus Citrulli* SARTORYI se présente en forme de *bâtonnet* mesurant de 0,3 à 4,5 μ en longueur,
de 0,28 à 0,52 μ en largeur (Fig. V).

ou de *coccobacille* mesurant :

de 0,3 à 1,2 μ en longueur
de 0,25 à 1,00 μ en largeur (Fig. VII).

CHAPITRE II.

PROPRIÉTÉS BIOLOGIQUES.

Nous savons aujourd'hui que les caractères morphologiques et culturaux, les propriétés chimiques et physiologiques sont plus ou moins relatives et dépendent en grande partie des conditions physiques et chimiques, dans lesquelles les bactéries sont cultivées. Il est donc indispensable, avant d'aborder l'étude des propriétés biologiques et physiologiques, de fixer les conditions les plus favorables et les limites extrêmes qu'un organisme demande pour pouvoir assimiler, se multiplier ou au moins conserver sa vitalité. L'importance de ces recherches est devenue d'une nécessité absolue, depuis qu'on a trouvé le moyen de fixer très exactement la concentration en ions H d'un milieu et qu'on a pu constater que l'assimilation d'un organisme est en rapport direct avec cette concentration et qu'il y a une relation étroite entre ces phénomènes.

Afin de réaliser ces conditions, il fallait tout d'abord composer un milieu synthétique facilement réalisable avec des produits stables et purs et satisfaisant aux exigences de notre Bactérie. A cet effet, nous avons tout d'abord préparé le milieu suivant :

Phosphate de soude ($PO^4HNa^2+12\,H^2O$) ..	2,	grs.
Sulfate de Magnésie	1,	»
Succinate d'ammoniaque	2,5	»
Glucose pur.....	5,	»
Eau distillée	1.000	cc.

A 10 cc. de ce milieu nous étions obligés d'ajouter un cc. de solution de Na OH N/10 pour obtenir le virage d'une solution de phénolphtaléine à 1 %. Une solution pure de succinate d'ammoniaque du commerce a toujours une réaction légèrement acide (1 gr. de ce sel demande toujours environ 10 cc. de Na OH N/10 ou 0,4 de soude).

Ayant ainsi un milieu strictement neutre, nous avons préparé avec ce substratum de base, trois milieux à concentration en ions H différents :

Le 1er était fixé à un .... pH = 5,6
Le 2e „ „ „ „ .... pH = 7,0
Le 3e „ „ „ „ .... pH = 7,8

Les 3 milieux ont été ensemencés dans des conditions analogues avec la même souche bactérienne, cultivée sur bouillon de viande, en introduisant à leur surface une même quantité d'émulsion microbienne. Après 8 jours de séjour à l'étuve le développement des cultures était peu satisfaisant, mais nous avons cependant pu déjà constater ici une faible diffusion dans le milieu de pH = 6,4 d'un pigment bactérien.

Par la suite nous étions alors amenés à modifier notre milieu de la façon suivante :

Asparagine	3,0	grs.
Phosphate bipotassique	1,0	»
Sulfate de fer	trace	
Chlorure de calcium	0,1	«
Sulfate de magnésium	0,3	»
Chlorure de sodium	0,1	»
Glucose	5,0	»
Eau distillée	1.000	cc.

C'est ce milieu que nous avons toujours désigné au cours de notre travail par le terme : *Milieu synthétique F.*

Il a été amené aux trois pH cités plus haut, et après ensemencement les cultures ont été placées à des températures de + 15°, + 27°, + 37°.

En même temps nous avons ensemencé des milieux au bouillon de viande, au bouillon de viande glycériné, au jus de pomme de terre carbonaté et des milieux végétaux de melon.

Après un séjour de 24 — 48 heures, de 4 et 8 jours dans les différentes étuves, nous avons examiné comparativement le développement et la luxuriance des cultures. Nous avons ainsi constaté que microscopiquement et macroscopiquement notre bactérie se développait normalement, d'une façon satisfaisante et abondante, sur notre milieu synthétique, qui constitue par conséquent un milieu très favorable et de choix pour le *Bacillus Citrulli* Sartoryi (Fig. IV).

C'est donc avec ce milieu synthétique F., que nous allons effectuer l'étude biologique de notre bactérie.

La croissance et la multiplication de notre bacille sur ce milieu sont très rapides à la température de + 22°. Nous avons alors tout d'abord déterminé la courbe optima de croissance à cette température en ce qui concerne la réaction du milieu de culture. La technique employée a été celle indiquée par J. MEYER (124).

Nous avons constitué trois séries de tubes à concentration en ions H différentes depuis pH = 4,2 jusqu'à 9,2 et chaque série a été ensemencée avec notre bacille. Les mesures ionométriques ont été effectuées avec le *potentiomètre* à électrode d'antimoine. La première série ensemencée a été examinée après 48 heures et après 4 jours de culture. La culture a été filtrée à travers un filtre de Jena; le filtre est pesé avant et après la filtration, après un séjour à l'étuve à + 55° jusqu'à poids constant. La récolte optima indiquant le milieu maximum de concentration en ions H pour la vitesse de croissance du *Bacillus Citrulli* SARTORYI a ainsi été fixée à un pH = 7,3.

La deuxième série de tubes ensemencés nous a montré que les limites de croissance pour le *Bacillus Citrulli* sont situées dans les conditions ci-dessus données, à des concentrations en ions H inférieures à pH = 4,73 et supérieures à 8,84. Les mesures de la concentration en ions H après une culture de 24 jours sur tous les milieux, nous a démontré que la Bactérie, par sa croissance et son assimilation sur notre milieu synthétique F., amène une acidification constante, qui est située à peu près aux environs de pH = 5,8 après 3 semaines de culture. D'autre part, la vitesse de croissance et la récolte sont à peu près identiques pour des milieux à des pH situés entre 6,4 et 7,6, abstraction faite de l'involution des formes bactériennes contrôlables par le microscope et la formation d'un pigment bactérien diffusible dans le milieu.

1) Action de la chaleur.

Pour déterminer la résistance de la Bactérie vis-à-vis de la chaleur, nous avons employé des cultures âgées de 15 jours. Une série de pipettes de PASTEUR de petit diamètre ont été aseptisées et remplies à moitié avec des milieux renfermant les cultures émulsionnées par agitation. Puis les deux extrémités des pipettes ont été scellées avec précaution,

et les ampoules ainsi obtenues sont placées dans des B. M. réglés à des températures fixées à + 18°, + 37°, + 42°, + 50°, + 60°.

Un séjour de 5 minutes à + 60° a tué la bactérie, car les nouveaux milieux ensemencés avec ses germes sont restés invariablement stériles. Un chauffage de 12 minutes à + 50° suffit de même pour arrêter la vitalité de la Bactérie. D'un autre côté, l'organisme est beaucoup moins sensible à la température de + 42°. Des cultures chauffées pendant 2 heures à cette température, n'ont pas été tuées, et ont repoussées, réensemencées sur nouveau milieu et placées à + 22°. Une culture scellée a été placée d'autre part pendant 48 heures dans un seau renfermant de la glace et du sel marin. La vitalité du bacille n'a cependant pas souffert de ce traitement. Par contre la bactérie est très sensible à la dessication. Des frottis effectués et desséchés dans le vide ont été ensuite enveloppés dans du papier-filtre stérilisé. Un séjour de 1 minute à la chaleur sèche de + 60° et de 5 minutes à la chaleur sèche de l'étuve à + 50° a suffi pour tuer tous les germes et 15 minutes à + 40° nous ont donné le même résultat.

Pour étudier et établir les *températures optima, maxima, et minima* de culture de notre bactérie, nous avons placé des milieux ensemencés au pH = 7,3 dans des étuves réglées à + 8°, 15°, 22°, 32°, 37° et + 42°.

La bactérie évolue encore très lentement à + 8° et à + 37° (à + 42° plus de développement), mais ces deux degrés thermiques doivent être considérés comme la limite de température, et constituent le minimum et le maximum de température culturale. La vitesse de croissance et le poids de la récolte sont à peu près identiques pour les tempéra- de + 15° et + 32°. Mais la luxuriance et la richesse sont, sans aucun doute, les plus remarquables et les plus prononcées à la température culturale de + 22°. Le développement du *Bacillus Citrulli* Sartoryi se fait avec son maximum d'intensité et de rapidité à des températures de + 18° à + 25° et la courbe de température doit avoir son point culminant à + 22° sur un milieu ajusté à un pH optimum de 7,3.

2) **Action de la lumière.**

La lumière n'exerce pour ainsi dire aucune action d'arrêt sur le développement de la Bactérie. Des cultures

ont été placées pendant 2 mois à des endroits où elles étaient exposées à une insolation directe. Les bacilles n'ont jamais perdu ou modifié leur vitalité ou leurs propriétés physiologiques.

3) Aérobiose et Anaérobiose.

Le *Bacillus Citrulli* SARTORYI ensemencé sur les milieux liquides donne très tôt un léger voile à la surface du substratum. Mais dans la profondeur du tube le dépôt bactérien augmente aussi très vite pendant la culture; de même si on ensemence un milieu solide en gélose ou gélatine par le procédé en piqûre, on constate que la Bactérie se développe aussi dans le canal d'inoculation dans toute sa profondeur.

Il y a donc lieu de se demander, si le *Bacillus Citrulli* SARTORYI n'est pas un anaérobie facultatif.

A cet effet, nous avons effectué des cultures par le procédé à l'huile de vaseline de LEGROS et par la méthode à l'hydrogène de ROUX. Pour le contrôle nous avons plus tard refait encore l'expérience dans la cloche à vide à 70 millimètres.

Nous avons ainsi pu constater que notre Bacille peut se développer presque normalement en présence d'une pression réduite d'oxygène, et que dans ces conditions sa fonction chromogène n'est nullement inhibée. Dans une atmosphère dépourvue totalement d'oxygène, la Bactérie ne se développe guère ni à + 18° ni à + 22°, mais les germes gardent constamment leur vitalité et des cultures anaérobies, mises après 4 mois de séjour à l'étuve à vide, reprennent très vite au contact de l'air leur développement et leur fonction chromogène.

CHAPITRE III

CARACTÈRES CULTURAUX SUR LES DIFFÉRENTS MILIEUX.

Solution de *peptone.*
Bouillon simple.
Bouillon peptoné.

Sur ces milieux les caractères des cultures sont presque identiques. Nous envisageons chaquefois des cultures effectuées :

1) à + 37° dans un milieu de pH = 7,6
2) à + 22° » » » » = 7,6
3) à + 37° » » » » = 6,4
4) à + 22° » » » » = 6,4

Tous les milieux ont toujours été ensemencés à l'aide de prélèvements bactériens d'une culture sur milieu synthétique F. âgée de 15 jours et effectués au moyen de la pipette de PASTEUR graduée et stérile, de sorte que pour tous les milieux il y avait au début présence d'hormogones favorisant le départ des cultures et évitant ainsi un facteur d'erreur dans l'interprétation des observations macroscopiques.

Dans les milieux soumis aux conditions signalées au 1° nous avons constaté l'apparition d'un voile léger dès les premières 48 heures. Après trois jours celui-ci devient plus marqué et il apparaît un léger trouble uniforme dans le milieu. Les tubes s'éclaircissent cependant très vite en abondonnant un dépôt d'un blanc neigeux. Le voile se déchire bientôt, un anneau se fixe aux parois du tube, et prend une coloration blanc-grisâtre. Dès le sixième jour la culture ne semble plus se développer et l'évolution semble arrêtée.

Le voile est forme d'éléments bacillaires assez longs; le dépôt est constitué d'agglomérations de formes coccobacillaires.

Dans les milieux soumis aux conditions du 2° l'aspect de la culture est à peu près pareil, mais le trouble dans le milieu n'apparaît que vers le cinquième ou sixième jour et la poussée devient beaucoup plus luxuriante. Le voile reste très longtemps à la surface du liquide. Le dépôt est beaucoup moins abondant. Mais le développement s'arrête de même très tôt et les propriétés nutritives de la peptone semblent très limitées.

Ceci pouvait être constaté :

Dans les milieux soumis aux conditions 3° et 4°, nous avons eu des résultats tout à fait identiques; une croissance assez limitée, formant d'abord un voile fragile, plus ou moins fugace, un trouble léger et uniforme du milieu tout d'abord, puis la formation d'un dépôt, plus riche dans les milieux aux pH = 6,4 que dans ceux de pH = 7,6.

Jamais il ne se forme ni bulles de gaz, ni pigments diffusés. Exceptionnellement, sur une solution de peptone CHAPOTEAUT placée à + 22° et ajustée au moyen de l'acide chlorhydrique à un pH = 6,4, ensemencé, comme d'ordinaire, avec une souche pure, en prenant toutes les précautions d'asepsie, nous avons vu apparaître une coloration vert jaunâtre. La culture, après s'être troublée dès les premiers jours, et formé un dépôt abondant blanchâtre, montra après 12 jours d'ensemencement une très faible teinte jaune pâle, qui dans la suite s'accentua et devint vers le dix-huitième jour de culture nettement vert jaunâtre.

Nous avons examiné microscopiquement cette culture et nous avons pu nous assurer qu'aucune contamination par accident ne s'était produite.

La peptone à elle seule paraît donc suffire au *Bacillus Citrulli* SARTORYI comme source d'azote et de carbone, mais c'est évidemment un aliment très médiocre, qui ne paraît jouer qu'un rôle tout à fait accidentel, et très exceptionnel, dans la fonction chromogène de notre organisme.

1) Bouillon de viande glycériné.

La culture en bouillon de viande glycériné présente les mêmes caractères que sur bouillon simple, mais la récolte sur les milieux répondant aux quatre conditions indiquées antérieurement est, comparativement au bouillon simple, sensiblement plus abondante. La glycérine semble donc être

attaquée par l'organisme, auquel elle peut servir d'aliment hydrocarboné. Ce trialcool a aussi une influence sur la fonction chromogène du bacille. Ceci devient apparent sur les milieux placés à + 22°.

Sur le bouillon de viande glycériné de pH = 6,4 et cultivé à + 22° il se forme une pellicule fragile, dont les bords adhèrent fortement aux parois du tube ou du ballon. La partie moyenne se déchire très vite et il se forme dès le troisième jour un trouble dans le milieu de culture avec un dépôt gris au fond du tube. Puis le liquide devient de nouveau limpide; à ce moment, vers le sixième jour, nous voyons une faible diffusion, d'une teinte rose très pâle qui commence à la partie supérieure du milieu et se propage lentement en profondeur. Mais l'évolution cesse bientôt et la couleur du bouillon limpide reste constamment d'un rose atténué.

Le bouillon glycériné placé à + 22° et de pH = 7,6 donne un voile un peu plus résistant à la surface du liquide, et dès le troisième jour, nous voyons ici l'apparition d'une teinte vert jaunâtre, très peu prononcée au commencement. Cette coloration s'accentue très peu dans la suite, mais quelquefois vers le huitième ou le dixième jour la couleur verdâtre commence, surtout vers les zones supérieures, à faire place à un ton rose, qui cependant disparaît par la suite dans la troisième semaine et la coloration verte persiste alors continuellement.

Pour étudier les causes de ce phénomène nous avons dans une série de tubes, contrôlé les variations de la concentration en ions H pendant l'évolution du bacille. Nous nous sommes alors rendu compte que dans les milieux à pH = 6,4 dès le huitième ou dixième jour de culture, le milieu a atteint une acidification telle que le pH est monté à environ 5. Ceci peut être dû tout d'abord à une dégradation de la glycérine, donnant naissance à des acides organiques, mais nous croyons que l'action du bacille sur le trialcool est très vite épuisée et qu'alors celui-ci continue à transformer les albuminoïdes. A ce moment il doit déjà se produire un arrêt des multiplications microbiennes; les ferments protéolytiques continuant leur œuvre amènent alors le milieu à une acidité terminale située dans ces expériences à pH = 4,15. C'est donc seulement sous l'influence de cette acidité que se produit le virage du chromogène vers la teinte rose.

Mais de toute façon, si le *Bacillus Citrulli* SARTORYI est capable d'attaquer la glycérine, il ne profite que très peu de cet aliment. Ce caractère semble rapprocher notre Bactérie du groupe du *Bacillus mucosus capsulatus*, proche parent lui aussi du *pneumobacille* de FRIEDLÆNDER isolé par FASCHING, des malades grippés en 1890, et dont une des propriétés biochimiques différentielles avec ce dernier est justement l'attaque légère de la glycérine.

2) **Bouillons sucrés.**

L'addition aux solutions de peptone ou aux bouillons de 3 % de monosaccharides tels que *glucose, galactose, lévulose,* ou de 5 % de disaccharides tels que *saccharose, maltose, lactose,* ou *mannite* a une influence très favorable sur le développement du bacille, aussi bien à + 37° qu'à + 22°; entre tous les sucres c'est cependant le *glucose* qui favorise le plus la croissance de notre organisme; le *saccharose* et le *maltose* sont presque aussi favorables. La bactérie donne sur tous ces milieux une pellicule épaisse, très compacte et homogène.

Il reste toujours en voile à la surface et rarement au bout de quatre à six semaines de culture celui-ci se déchire pour tomber en grands flocons en profondeur. On peut néanmoins constater une différence entre les cultures sur milieux de pH initial de 6,4 et de pH = 7,6 placés à + 22°. Les premiers milieux se troublent très tôt, puis il se forme un dépôt abondant d'une coloration blanche au fond du tube. Ensuite le milieu s'éclaircit et on voit dès le deuxième ou troisième jour l'apparition d'une teinte rose claire dans le substratum. Au bout de 15 jours de culture cette teinte devient nettement rouge brique et les éléments bactériens restent toujours d'un blanc sale. Sur les milieux de pH = 7,6 le développement est un peu plus rapide au commencement, mais le culot est toujours moins abondant et la pigmentation rose fait toujours défaut, étant remplacée par une coloration vert jaunâtre, qui quelquefois vire un peu au rose; mais ce caméléonage est toujours très fugace et la teinte verdâtre reste dominante. En contrôlant de plus près ce phénomène nous avons pu constater que la bactérie en milieu glucosé à pH = 7,6 fait augmenter dans la première semaine de

culture la concentration en ions H jusqu'à un pH de 5,93; mais à ce moment il y a un arrêt dans l'acidification et la courbe de réaction remonte vers l'alcalinité, pour rester fixe au bout de 12 à 14 jours, époque où la réaction terminale est de pH = 8,35 environ. Dans ce cas, en présence d'un hydrate de carbone facilement assimilable et au pH initial de 7,6 la bactérie semble d'abord attaquer les sucres, produisant une acidification notable, puis cette attaque s'arrête; tandis que les matières azotées continuent à être transformées et par leur décomposition la réaction redevient définitivement alcaline. Il semble donc que l'attaque de la matière quaternaire est différente dans les deux cas soit que nous partions d'un pH initial de 6,4 ou d'un pH initial de 7,6.

Ceci semble surtout être attribué à l'involution de la bactérie et la forme en bâtonnet doit produire des ferments protéolytiques beaucoup plus actifs que la forme coccobacillaire, qui pousse dès le commencement du développement dans les milieux sucrés légèrement acides au début de la culture.

Jamais nous n'avons pu constater de dégagement gazeux sur les milieux des deux catégories.

Nous faisons dès à présent remarquer que la pigmentation rose apparaît dans nos milieux acides sucrés; qu'il y a cependant dans nos milieux alcalins sucrés cultivés à + 22° l'apparition constante d'un chromogène verdâtre, qui peut artificiellement, par acidification avec l'acide acétique ou chlorhydrique, être changé en rose ou rouge.

Nous aurons l'occasion de revenir sur ce phénomène.

3) **Solution de peptone gélosée**

Sur plaques de gélose ordinaire à pH = 6,4 ou pH = 7,6 peptonisée à 2 % et exposées à + 22°, on obtient le quatrième ou cinquième jour après l'ensemencement, une colonie de la taille et de la forme d'une lentille à surface unie, brillante et d'une couleur blanc grisâtre par réflexion et verdâtre par transparence.

Les jours suivants la colonie augmente très lentement; elle peut perdre sa forme ronde et devenir échancrée ou

festonnée. Plus tard la colonie prend un aspect visqueux blanchâtre, beaucoup plus blanc à la périphérie de la colonie qu'au centre.

Sur tube de gélose inclinée en strie, il n'y a encore le lendemain de la culture qu'un piqueté léger le long du trait d'ensemencement. Ces colonies confluent vers le troisième ou quatrième jour; vers le sixième jour on a une bande visqueuse à bords lisses, réguliers ou dentés, d'un blanc luisant.

La culture sur *bouillon peptoné gelosé* est assez semblable à la précédente. Le développement est lent et il apparaît rarement dans le milieu à pH initial de 6,4 une faible diffusion d'une teinte rose très pâle; ordinairement la gélose se colore en jaune sale.

Sur *gélose simple* sans addition, substrat n'ayant pas subi l'action de l'ammoniaque et de l'acide chlorhydrique, le bacille ne se multiplie pas; une simple addition d'asparagine à l'agar ordinaire ne suffit pas pour améliorer le milieu; mais une addition d'asparagine et de glucose ou de fécule de pomme de terre, donne suivant la réaction un rose vineux, ou un vert bleuâtre, avec un développement très abondant de la bactérie. La fécule favorise surtout l'apparition de la teinte bleue; le glucose celle de la teinte verdâtre dans les milieux alcalins.

Sur bouillon de viande sucré gelosé le développement est très intense. On voit toujours se former très vite un tapis épais à la surface de la gélose, qui devient rapidement visqueuse et d'un gris sale. Mais dès le troisième jour de la culture la pigmentation apparaît dans les couches sous-jacentes à pellicule bactérienne. La diffusion se fait assez lentement, et il faut souvent 4 à 5 semaines à + 22° pour que la coloration imprègne uniformément le milieu gélosé; mais les éléments bacillaires gardent toujours leur couleur gris sale non définie. Suivant les matières hydrocarbonées employées et la réaction initiale du milieu, on observe des teintes bleuâtres, verdâtres, rouges, violettes; à une température culturale de + 32° ou + 37° la matière chromogène fait défaut. Sur milieu gélosé ensemencé en piqûre, il ne se forme pas de bulles de gaz. Microscopiquement le tapis à la surface des milieux solides est presque uniformément constitué par des formes *coccobacillaires* (fig. VII).

4) Milieux végétaux.

Sur milieu de *pomme de terre*, la bactérie forme un enduit épais, visqueux, avec une couleur blanc sale. L'évolution est assez bonne, mais l'apparition d'une coloration fait toujours défaut.

Sur milieu de *carottes*, l'aspect macroscopique de la culture est identique que sur le milieu précédent.

Sur tranche de *melon* ou de *banane* stérilisée dans des tubes de Roux l'évolution de la culture est beaucoup plus rapide.

Dès le troisième jour on constate l'apparition d'une teinte rosâtre sur la tranche du fruit, limitant les colonies bactériennes. Plus tard le liquide se colore uniformément en rose violacé dans la profondeur du tube.

5) Milieux synthétiques.

Ayant ainsi constaté, comme nous venons de le décrire que :

1° La *Bacillus Citrulli* Sartoryi se développe aussi facilement sur milieu liquide que sur milieu solide;

2° que ses propriétés morphologiques sont beaucoup plus marquées et spécifiques sur les milieux liquides;

3° que la fonction chromogène est beaucoup plus prononcée, que la diffusion du pigment s'effectue plus facilement, et que l'apparition de cette propriété n'est pas du tout liée à une exposition en grande surface sur des substrats d'une certaine consistance, tel qu'on peut le constater souvent pour d'autres bactéries chromogènes, nous avons pensé que nous pouvions effectuer une étude bien plus précise et plus facile, en employant pour les recherches biochimiques et l'analyse de la matière colorante, des cultures sur un milieu de composition fixe.

Les raisons énoncées ci-dessus nous ont décidé à employer des milieux liquides, et nous avons déjà donné la formule du milieu synthétique, qui nous a fourni les résultats les meilleurs.

Sur ce milieu à base d'asparagine et de glucose nous avons obtenu des résultats de luxuriance et de vitesse de culture, qui étaient en tous points au moins égaux à ceux obtenus sur milieu au bouillon de viande sucré (fig. IV).

A la température de + 37° les cultures évoluaient toujours très vite, sous forme d'une pellicule très dense à la surface du substratum et donnant surtout dans le milieu à pH initial de 6,4 un dépôt très abondant. Nous avions toujours remarqué l'absence de bulles de gaz et d'un pigment chromogène. Les cultures placées à + 22° par contre, ont toujours donné naissance à une matière chromogène, qui dans l'un des cas était verdâtre, dans l'autre rose ou rouge; le pigment verdâtre a toujours viré au rose ou au rouge par addition d'une quantité suffisante pour une légère acidité, d'un acide minéral ou de l'acide acétique.

A l'examen microscopique des cultures évoluées sur ces milieux nous avons toujours constaté les caractères fixes et spécifiques de la bactérie déjà décrite dans le chapitre consacré à la morphologie du *Bacillus Citrulli* SARTORYI.

C'est donc ce milieu synthétique qui nous a servi pour l'étude des caractères biochimiques, et pour les recherches concernant la matière colorante.

CHAPITRE IV

PROPRIÉTÉS BIOCHIMIQUES.

Afin :

1° d'établir les milieux les plus simples et les mieux définis, pouvant servir d'aliments à notre bactérie;

2° de mettre en évidence les rapports qui existent entre la constitution chimique d'une substance et sa valeur nutritive;

3° de parvenir à expliquer la formation du pigment par le microbe en suivant la série des transformations chimiques d'un certain nombre de substances définies, permettant ainsi des conclusions sur la nature et la constitution de ce pigment, nous avons été amené tout d'abord à faire les expériences suivantes :

1) Action du Bacille sur les matières azotées et hydrocarbonées.

A) Cultures sur milieux minéraux, renfermant comme source d'azote un sel ammoniacal minéral.

B) Cultures sur milieux renfermant comme source d'azote un acide aminé, un amide, un sel ammoniacal d'acide organique.

C) Cultures sur milieux en présence d'alcools polyatomiques ou de sucres.

D) Cultures sur milieux renfermant des sels ammoniacaux minéraux et des substances hydrocarbonées.

E) Cultures sur milieux renfermant des substances quaternaires organiques et des sucres.

Le milieu de base pour ces expériences a toujours été le suivant :

Phosphate bipotassique	1,0 gr.
Sulfate de magnésie	0,5 »
Chlorure de sodium.....	0,5 »
Eau distillée	1.000 cc.

A ce milieu nous avons ajouté au fur et à mesure pour chaque cas à étudier la substance minérale ou organique, dont nous avons voulu constater l'influence sur le microbe et sur son métabolisme.

Dans chaque tube de culture nous avons introduit chaque fois 10 gouttes de la solution du produit à examiner. La recherche de l'ammoniaque, qui a pu se former au cours de l'assimilation des substances azotées, a été faite pour chaque cas de la façon suivante :

La culture en ballon renfermant 200 cc. de milieu est distillée en présence d'une trace de magnésie calcinée. Le distillat est recueilli dans un tube contenant quelques gouttes d'acide sulfurique à 10 %. Le liquide ainsi obtenu a été chaque fois divisé en deux parties : dans la première nous avons caractérisé l'ammoniaque par le réactif de NESSLER; dans la seconde nous avons ajouté 1 cc. d'une solution d'iodure de potassium à 10 % et quelques gouttes d'eau de *Javel;* en présence d'ammoniaque il se forme un précipité noir.

Pour la caractérisation de l'acide carbonique, nous avons effectué des cultures dans des tubes de BORREL reliés à l'appareil de BARCROFFT. Les observations ont duré chaque fois 48 heures. Pour éviter des erreurs provenant de la présence de l'oxygène, nous avons intercalé entre le tube de culture et l'appareil de BARCROFFT, un flacon barboteur renfermant du pyrogallate de potassium. A la fin de l'opération toute trace d'acide carbonique présent dans le milieu a été chassée en ajoutant de l'acide sulfurique à 10 % à raison de 5 cc.

En outre nous avons employé pour l'étude biochimique de notre Bactérie la méthode du *tube B.* indiquée par BESSON, RANQUE et SENEZ, qui est d'un emploi très simple et très pratique.

Ce procédé est basé sur l'action réductrice du microorganisme sur le rouge neutre, et les variations notables de cette propriété suivant la constitution du milieu de culture. Les sucres ajoutés en petites quantités à un milieu, favorisent la réduction; si on augmente progressivement cette quantité de sucre, l'action favorisante disparaît d'abord, puis fait place à une action contraire.

L'expérience est faite de la façon suivante avec le milieu de culture ci-dessous :

Eau de viande de bœuf	1.000 cc.
Glucose.....	4 gr.
Solution aqueuse de rouge neutre à 1 %.....	3 cc.

On répartit dans des tubes à essais assez larges et contenant un tube à hémolyse renversé qui sert de cloche à fermentation. Après stérilisation on ensemence et on place la culture pendant 48 heures à l'étuve à + 22°. On peut alors apprécier :

a) les phénomènes de réduction du rouge neutre;

b) Les phénomènes d'acidification et d'alcalinisation du milieu;

c) La production ou la non-production de gaz avec le glucose, et l'approximation de la quantité de gaz produite.

Les germes qui, sans réduire, acidifient, font virer la couleur à une teinte amarante; l'alcalinisation produit au contraire une teinte rose saumon ou porto.

La réduction se traduit par une fluorescence.

On peut donc avec cette technique, classer le germe ensemencé dans le groupe des réducteurs, ou des non-réducteurs, dans le groupe des germes inertes vis-à-vis des sucres, ou des germes attaquant les sucres avec gaz ou sans gaz.

Pour notre bactérie nous avons eu dans cette expérience les résultats suivants :

Teinte amarante (après 48 heures, plus tard masquée par l'apparition du pigment propre à la bactérie, et devenant un peu plus claire).

Pas de gaz.

Le *Bacillus Citrulli Sartoryi* est donc un *non-réducteur*, acidifiant le milieu par l'attaque du glucose, sans production de gaz, et se rapproche par ces caractères du *Bacille Typhique*.

Ces caractères ont été contrôlés à nouveau par le procédé de GRIMBERT et LEGROS au moyen du milieu suivant :

Glucose.....	2 gr.
Peptone	5 gr.
Eau distillée	100 cc.
Carbonate de calcium	2 gr.
Teinture de Tournesol	q. s.

Dans ce milieu la culture de la bactérie fait virer la couleur au rouge et cette teinte se maintient alors constamment; d'autre part, les acides produits par la fermentation du sucre mettent en liberté l'anhydride carbonique, et l'on constate dans le tube à hémolyse une forte production de bulles gazeuses, soulevant le tube.

A) Cultures sur milieux minéraux renfermant comme source d'azote un sel ammoniacal minéral.

Nous avons déjà indiqué dans un chapitre précédent un milieu à base de succinate d'ammoniaque, utilisé précédemment par nous et contenant aussi du glucose. Le milieu renfermant 2,5 gr. de succinate d'ammoniaque a permis à notre bactérie un développement, faible cependant, et à un pH de 6,4 nous avons remarqué l'apparition d'une coloration rougeâtre dans les milieux.

Les titres de solution de sels ammoniacaux ont été pour ces raisons fixés à une teneur identique à celui du milieu initial de succinate d'ammoniaque, c'est-à-dire que 10 gouttes avaient une teneur en ammoniaque équivalente à 0,011.

Nature du sel	Carbonate d'N H^3	Chlorhydrate d'NH^3	Azotate d'NH^3
P. M.	96	53,5	80
Teneur en NH^3	34	17	17
Quantité de sel correspondant à 0,011 d'NH^3	0,031	0,0346	0,0518
Titre de la solution ...	6,5 %	8 %	10 %
Résultat de développement	Néant	Néant	Néant
Pigment	Néant	Néant	Néant

B) Cultures sur milieu renfermant comme source d'azote un acide aminé, un sel ammoniacal d'acide organique, ou un amide.

Les conditions d'utilisation de ces sels étant les mêmes que les précédentes, nous reproduisons pour chacun d'eux les quantités calculées pour obtenir des solutions de titre ammoniacal toujours identique. Quant aux acides aminés ils ont été incorporés au milieu minéral à un titre tel que la

teneur en azote correspond exactement à celle qui est contenue dans 10 gouttes de solution de succinate d'ammoniaque à 1/10, donc à 0,0092.

Nature du sel	Succinate d'NH^3	Oxalate d'NH^3	Guanidine	Asparagine	Glycocolle	Tyrosine
P. M.	152	124	122	132	75	181
Teneur en NH^3 .	34	34	42	28	—	—
Teneur en N.....	—	—	—	—	14	14
Quantité de sel correspondant à 0,011 d'NH^3 ...	0,0491	0,0401	0,0265	0,0433	—	—
Quantité de sel correspondant à 0,0092 d'N.....	—	—	—	—	0,0492	0,1189
Titre de la solution	1/10	0,8/10	0,53/10	0,85/10	1/10	2,35/10
Résultat de développement	Néant	Néant	Néant	Néant	Néant	Néant
Pigment	»	»	»	»	»	»

Ces résultats sont donc strictement négatifs. Le développement de la bactérie est impossible sur un milieu renfermant des produits azotés minéraux d'un côté et de l'autre côté en présence des produits organiques renfermant à la fois de l'azote et du carbone. Nous voyons donc que le pouvoir protéolytique de notre champignon doit être restreint.

C) **Cultures sur milieux minéraux en présence d'alcools polyatomiques ou de sucres.**

Les milieux ont été préparés en ajoutant à notre milieu de base 10 gouttes par tube de solution à 10 % des diverses substances hydrocarbonées :

Substances	Résultats de développement	Résultats de pigmentation
Glycérine ...	Néant	Néant
Mannite	»	»
Dulcite	»	»
Glucose	faible développement	Coloration rose faible
Galactose ...	»	»
Saccharose .	Très faible développement	Très faible
Lactose	faible développement	»
Maltose	»	»

Nous voyons donc que les alcools polyatomiques sont encore inaptes pour l'assimilation du *Bacillus Citrulli ;* par contre les faibles traces de substance quaternaire nutritives apportées par les produits d'ensemencement introduits dans les milieux à base de sucres, ont suffit pour amorcer la culture et la production d'un pigment rose. D'autre part nous voyons que la *Bacillus Citrulli* est capable d'assimiler les sucres : *glucose, galactose, saccharose, maltose, lactose.*

D) et E) **Cultures sur milieux renfermant à la fois des sels ammoniacaux minéraux, où des substances azotées organiques et les substances hydrocarbonées.**

Les sucres mis en expériences ont été : le *glucose* et le *maltose,* les alcools polyatomiques ont été : la *glycérine* et la *dulcite.* Les quantités de substances introduites et la technique ont toujours été les mêmes.

Matière azotée	Développement	Coloration	Présence d'NH^3 dans la culture de 48 heures	Dégagement de CO^2 dans la culture après 4 jours sur	
				milieu initial	milieu carbonaté
Glucose					
Carbonate NH^3	faible	verte	présent	Néant	1 unité
Azotate d'NH^3	»	»	»	»	0 »
Succinate d'NH^3	»	faible rosé	néant	»	3 »
Asparagine	très bon	très forte	»	»	6 »
Glycocolle	assez bon	faible vert	présent	»	10 »
Peptone	très bon	vert ou rose	néant	»	10 »
Maltose					
Carbonate NH^3	très faible	faible vert	présent	néant	0 unité
Azotate NH^3	»	»	»	»	0 »
Succinate NH^3	faible	»	»	»	1 »
Asparagine	bon	forte rose	néant	»	6 »
Glycocolle	assez bon	verte	»	»	8 »
Peptone	très bon	très forte verte ou rose	»	»	10 »
Glycérine					
Carbonate NH^3	néant	néant	néant	néant	0 unité
Azotate NH^3	»	»	»	»	0 »
Succinate NH^3	très faible	verte	présent	»	0 »
Asparagine	bon	faible rose	néant	»	4 »
Glycocolle	très faible	faible verte	présent	»	0 »
Peptone	très bon	faible rose	néant	»	6 »
Dulcite					
Carbonate NH^3	néant	néant	néant	néant	0 unité
Azotate NH^3	»	»	»	»	0 »
Succinate NH^3	»	»	»	»	0 »
Asparagine	»	»	»	»	0 »
Glycocolle	»	»	»	»	0 »
Peptone.	faible	faible rose ou verte	quelquefois présence	»	4 »

De ces expériences nous pouvons tirer les conclusions suivantes :

D'une manière générale les matières quaternaires organiques semblent de meilleurs aliments azotés que les sels ammoniacaux. En absence de produits ternaires, soit alcools polyatomiques, mais surtout des sucres, aucun produit chromogène n'a pu être démontré. La dulcite n'est pas attaquée par le bacille et ne paraît pas intervenir dans la production du pigment. La glycérine de même est à elle seule un aliment peu assimilable, elle ne joue aucun rôle dans l'apparition du pigment, car si on bloque dans le milieu à base d'asparagine-glycérine, la fonction amine par l'acide chlorhydrique, de sorte que seule la fonction amide reste disponible, on ne peut plus constater la formation de la coloration; dans l'expérience avec le glycocolle, la fonction amine semble aussi seule responsable de la production chromogène.

D'autre part les produits quaternaires employés seuls sans addition de substances ternaires, sont inaptes à fournir la matière chromogène. Il faut la présence d'un aliment ternaire, si impropre que soit cette matière à l'assimilation (comme la glycérine par exemple); sa présence est indispensable pour la production du chromogène. Il se forme alors dans ce cas, une très faible production d'acide, puis cette réaction ne tarde pas à être neutralisée par les bases résultant de l'attaque des substances azotées, puis on note la présence de l'NH^3 libre dans la culture, donc pratiquement tout se passe comme si la matière quaternaire avait existé seule dans le milieu. Si le développement de la bactérie continue, il se produit une nouvelle acidification et le chromogène vire au rose. Ceci devient encore plus apparent dans les milieux à bases de glucose ou de maltose. Ici, en présence de tout produit azoté, soit minéral, soit organique, nous constatons la formation de la substance chromogène. Cette matière peut diffuser dans le milieu avec une teinte verte ou rose à $+ 22^0$ à $+ 37^0$, cependant le milieu semble invariablement incolore et clair, mais ceci n'est qu'apparent, car si on retire le milieu de 37^0 et que l'on ajoute une légère quantité d'acide jusqu'à faible acidité, la coloration rose apparaît, le chromogène existe donc toujours dans un milieu renfermant un sucre ou une autre substance ternaire assimilable, et répondant aux conditions nécessaires à sa formation. Le colorant

est aussi, comme nous le constatons dans ces expériences, en relation directe avec la réaction du milieu, car chaque fois que nous avons pu trouver la présence d'ammoniaque libre au deuxième jour de la culture, le chromogène apparut sous sa variante verte, tandis que, chaque fois que le développement et l'évolution du bacille a été très prononcé et que l'assimilation ternaire a pris le dessus sur l'assimilation azotée, l'acidification devenant très marquée et dominant pendant toute la durée de la culture, le chromogène diffuse dans le milieu avec une teinte rose ou rouge très constante. La formation du pigment dépend donc de la présence dans le milieu de substances ternaires et elle est d'autant plus marquée que cette matière est plus favorable au métabolisme du bacille, devenant la plus prononcée avec les hydrates de carbone.

2) **Recherches des propriétés protéolytiques.**

a) *Action sur le sérum coagulé.*

Ensemencé sur tube de sérum coagulé, le *Bacillus Citrulli* pousse très vite; la culture est visqueuse, blanc-grisâtre. L'aspect microscopique des prélèvements sur ce milieu nous montre la forme en bâtonnet. Le sérum n'est pas liquéfié et nous n'observons jamais la présence d'une substance chromogène

b) *Action sur le blanc d'œuf*

Dans des tubes de bouillon de viande de pH = 7,6 nous avons introduit des petits cubes de blanc d'œuf coagulé par la chaleur et stérilisé à l'autoclave. Le milieu a été ensemencé et placé à des températures culturales de + 22° et + 37°. Le *Bacillus Citrulli* se développe très normalement, en voile blanc à la surface du milieu, formant ensuite un dépôt crémeux au fond du tube. Mais nous n'avons jamais pu constater la dissolution ou une attaque du blanc d'œuf par la bactérie.

c) *Action sur la gélatine.*

Sachant que généralement l'attaque de la gélatine est plus prononcée chez les bactéries par les enzymes protéolytiques, que vis-à-vis des autres matières protéolytiques,

et que la gélatine est ordinairement plus facilement dissoute que les albumines coagulées, nous avons ensemencé sur un milieu gélatine-peptone en piqûre et en surface sur tubes inclinés.

Par la première méthode nous avons obtenu une culture très caractéristique, avec formation d'une petite ampoule au tiers supérieur. Plus tard il se forme un tapis d'un blanc brillant à la surface de ce milieu. Dans celui-ci apparaît vers le quatrième jour de la culture autour de la tache due à l'ensemencement par piqûre, une coloration rose ou verte suivant les conditions de culture et cette coloration diffuse par suite lentement à travers tout le milieu; car la diffusion du pigment est aussi intense dans le fond du sillon de la piqûre qu'en surface.

Sur la gélatine peptonée en tube incliné, nous avons observé la formation d'un tapis blanc crémeux et l'apparition de la pigmentation naissant au niveau de contact de la culture avec le substratum et diffusant plus tard à travers tout le milieu. Mais la gélatine n'est jamais liquéfiée par l'action de la bactérie.

3) Recherche de l'hydrogène sulfuré.

Un grand nombre de microbes produisent de l'hydrogène sulfuré aux dépens des albuminoïdes, caractère de différenciation très important pour le diagnostic des bactéries. Nous avons préparé des tubes renfermant 5 cc. de gélose. Après stérilisation et liquéfaction de la gélose, nous avons introduit dans chaque tube une goutte d'une solution d'acétate neutre de plomb à 10 % préalablement stérilisée. On mélange avec soin et on refroidit sous le robinet d'eau. Ce milieu est ensemencé avec le *Bacillus Citrulli* en piqûres profondes. Le culot gélosé est resté invariablement blanc-grisâtre, et le bacille ne noircit pas le plomb; la production de l'hydrogène sulfuré fait par conséquent défaut.

4) Recherche de l'Indol.

Le bacille a été ensemencé sur une solution de peptone Chapoteaut à 5 %. Après cinq jours de culture nous avons ajouté un centimètre cube de solution de nitrite de potassium à 1 °/₀₀ et 8 gouttes d'acide sulfurique pur et concentré. On porte la partie supérieure du tube à l'ébullition, il apparaît

alors une coloration rose très nette. Quand la réaction est terminée, on introduit 2 cc. d'alcool amylique et on agite avec précaution. On laisse reposer pour que la séparation des deux liquides s'effectue et on constate une coloration rose très marquée de la couche alcoolique.

Il y a donc production d'indol.

Mais dans la suite de nos expériences nous avons remarqué que la présence de notre substance chromogène sécrétée par le bacille aurait pu intervenir dans cette réaction et nous induire en erreur. Pour cette raison nous avons plus tard refait cette expérience de la façon suivante :

Distillation du milieu de culture après acidification légère par l'acide chlorhydrique; alcalinisation légère du distillat par la soude et redistillation. Dans ce liquide bidistillé nous avons encore pu caractériser la présence de l'indol par la méthode précédente.

5) **Recherche des nitrates.**

Un milieu de :

Peptone Chapoteaut	10 gr.
Chlorure de sodium.....	5 »
Nitrate de potassium	1 »
Eau	1.000 cc.

a été ensemencé et cultivé à + 37° pendant 5 jours. Si on ajoute ensuite lentement à la culture 2 cc. d'acide chlorhydrique pur, on voit apparaître une teinte rose, qui s'accentue pendant plusieurs heures. La *Bacillus Citrulli* produit donc sur le milieu précédent des nitrites, car la réaction *indol-nitreuse*, (réaction du *rouge* de *Choléra*), est positive.

6) **Action sur le lait**

Nous avons contrôlé l'action du bacille sur le lait en le cultivant sur lait tournesolé à + 22° ou + 37°.

Dès le deuxième jour nous avons constaté que la teinte vire franchement au rouge; il y avait donc fermentation du lactose, et par suite production abondante d'acide. La caséine est précipitée par la formation de l'acide lactique. Au bout de 8 à 10 jours le coagulum formé commence à disparaître et le lait devient limpide, prenant une coloration jaune rougâtre.

Sur milieu de lait seul nous observons la précipitation de la caséine, formation d'un pigment rose, qui, par la suite, devient par la dissolution de la caséine, jaune sale.

Le *Bacillus Citrulli* ne semble donc pas produire un ferment lab, il attaque lactose et sécrète une caséase.

7) **Action sur les sucres.**

Nous avons déjà vu au commencement de ce chapitre que le *Bacillus Citrulli* assimile les sucres suivants : *glucose, galactose, saccharose, maltose, lactose.*

Afin de vérifier ces constatations et d'examiner l'action de la bactérie sur d'autres substances ternaires, nous avons eu recours au procédé de Grimbert et Legros déjà mentionné antérieurement, dans les recherches du pouvoir réducteur et d'acidification de notre bacille. Nous avons donc employé un bouillon carbonaté tournesolé auquel nous avons ajouté au fur et à mesure les matières ternaires à examiner.

Nous avons ainsi constaté que le *Bacillus Citrulli* Sartoryi, en présence de peptone comme substance quaternaire, attaque rapidement le glucose, le lévulose, le maltose, le saccharose et la mannite. La teinte rouge du tournesol apparaît déjà dans ces milieux de la seizième à la vingt-quatrième heure, et le tube à hémolyse se remplit d'acide carbonique mis en liberté par le carbonate de calcium. L'attaque du lactose et de la glycérine est plus faible et plus lente et ne débute souvent qu'au cours du deuxième ou troisième jour. La dulcite, elle, n'est pas attaquée, et ne peut servir d'aliment à la bactérie. Tous ces sucres sont assimilés avec une production très remarquable d'acide dans le milieu, mais le dégagement de gaz par l'action directe de l'organisme sur les sucres est toujours négatif; par conséquent le *Bacillus Citrulli* rentre dans la catégorie de microbes attaquant les sucres, mais sans dégagement de gaz.

8) **Action vis-à-vis de la cellulose.**

Dans le chapitre où nous avons exposé l'origine de notre souche bactérienne, nous avons déjà dit, que la bactérie ne peut pas être l'agent primaire de la maladie des *Cucurbitacées,* puisqu'elle n'attaque pas les couches cellulosiques de la membrane de ces fruits.

Pour ces raisons nous avons repris les expériences de A. SARTORY, R. SARTORY et J. MEYER (125). En plaçant des cultures de *Bacillus Citrulli* directement à la surface de melons ou de bananes nous n'avons jamais pu reproduire de lésions de ces fruits. Si par contre nous prenons la précaution de léser artificiellement la membrane du fruit, ou si nous piquons avec l'ensemenceur chargé du produit bactérien dans la profondeur du tissu végétal, les caractères de la maladie n'ont jamais tardé à apparaître dès le troisième jour après l'inoculation.

D'autre part, sur des coupes microscopiques effectuées avec des morceaux de fruits infectés, nous n'avons pas pu observer l'intrusion de la bactérie à travers les cuticules cellulaires, et la présence de germes à l'intérieur même des cellules végétales. Par contre, les amas bactériens se trouvent toujours dans les tissus intersticiels du fruit, écartant même les cellules de place en place.

Nous avons de plus essayé d'isoler, si possible, un ferment cellulolytique éventuel. Pour cela nous avons cultivé la bactérie sur des coupes de melon pendant 4 semaines dans des boîtes de PÉTRI. Puis nous avons ajouté à ce milieu 5 cc. de toluène, substance bactéricide, mais sans action sur les ferments. Puis nous avons exprimé dans un mortier le substratum et le tout a été filtré. Le filtrat a été mis en présence de cellulose pure à + 37°. Aucune action sur la cellulose n'a pu être observée. Le bacille cultivé dans les conditions les plus favorables en aérobie et anaérobie et renfermant comme matière ternaire de la cellulose pure râpée, n'a pas évolué. Par conséquent nous nous croyons en droit de conclure que le *Bacillus Citrulli ne produit pas* de ferment *cellulolytique* et qu'il est incapable d'assimiler la cellulose.

9) Recherche sur la différence du métabolisme assimilateur du Bacillus Citrulli Sartoryi en culture incolore et en culture colorée.

Nous avons pu constater que la bactérie se développe sur certains milieux dans des conditions définies, soit sans produire de matière chromogène, soit avec l'apparition d'une teinte verdâtre ou diffusion dans le milieu, d'un pigment rose ou rouge très important.

Monsieur le Professeur SARTORY nous a posé le problème suivant : Essayer d'examiner s'il y avait une relation entre la formation chromogène et le métabolisme vital de la bactérie ; rechercher si l'absence de la production du pigment pouvait être considérée comme une diminution de la vitalité et du pouvoir assimilateur du bacille ou si tout le phénomène du pouvoir chromogène se passait sans influence aucune sur les autres caractères du bacille. Pour résoudre cette question, nous avons eu recours à des recherches quantitatives concernant l'assimilation et les propriétés dégradatrices du bacille vis-à-vis de la peptone comme matière azotée et vis-à-vis du glucose et du saccharose comme substance hydrocarbonée. Nous avons préparé notre milieu minéral :

Phosphate bipotassique	1,0 gr.
Sulfate de magnésie	0,5 »
Carbonate de soude	0,5 »
Eau distillée	1.000 cc.

A ce milieu nous avons ajouté soit de la peptone seule, à raison de 2 grammes pour 100 gr. de milieu, soit de la peptone plus glucose à 3 %. Toutes les cultures ont été effectuées à la température de + 37°. La solution de peptone a été ramenée au pH = 7,6. Le milieu glucosé a été ajusté une première fois au pH = 7,6 et une seconde fois au pH = 6,4. Nous avons ainsi obtenu une culture sans chromogène, une autre avec un pigment vert, et une troisième avec une coloration rouge.

Pour évaluer l'activité du pouvoir assimilateur vis-à-vis de la peptone nous avons eu recours à la mesure volumétrique de la quantité d'acides aminés formés en employant la méthode de formoltitration de SÖRENSEN (126).

Mode opératoire :

100 cc. de milieu à examiner renfermant 2 gr. de peptone sont mis avec de la soude N/10 en présence de phtaléine de phénol comme indicateur. La quantité de soude employée pour faire virer les indicateurs représente les acides libres. Après le virage on ajoute 10 cc. de formol exactement neutralisé au préalable.

La mise en évidence de la fonction acide des acides aminés, par le bloquage de la fonction amine se produit, et la nouvelle quantité de soude N/10 nécessaire au virage donne les acides aminés totaux.

Nous avons mis en contact 5 récipients de culture contenant 100 grs. de milieu avec du ferment trypsique de POULENC; ces ballons ont été placés à la température de + 37° à un pH de 7,6 pendant 15 jours. Après cette période la dégradation de la peptone en acides aminés était complète.

Nous avons d'abord dosé les acides libres préexistants dans le milieu de culture vierge à 2 % de peptone, puis par la méthode de SÖRENSEN, nous avons obtenu la quantité des acides aminés totaux résultant de la dégradation de la peptone. Enfin nous avons dosé les milieux ensemencés avec notre bactérie pendant 15 jours, de la même façon, c'est-à-dire en neutralisant d'abord le milieu pour déterminer ensuite les acides aminés formés par l'action du bacille.

A une troisième série de cultures nous avons alors ajouté 10 cc. de toluène, afin de supprimer l'action de la bactérie, et au milieu ainsi stérilisé nous avons encore incorporé du ferment trypsique de POULENC. Le tout est placé à + 37° et on a fait appel encore une fois à la méthode de formol-titration. Les dosages ont été effectués sur 5 ballons et les chiffres indiqués sont la moyenne des résultats obtenus. Les dosages ont été pratiqués le premier, troisième, sixième, neuvième et quatorzième jour après l'ensemencement.

Les tableaux suivants expriment les résultats trouvés pour 100 cc. de milieu en centimètres cubes de soude décinormale.

Milieu peptone glucose à pH : 6,4

Jours	Acide libre	Acides aminés totaux	Acides aminés mis en liberté par l'action du bacille	Acides aminés non dégradés par le bacille	Acides aminés employés par le bacille
1	9	30	0	30	0
3	18,5	30	12	17,8	0,2
6	17,5	30	10	16,9	3,1
9	13,5	30	12,5	14,3	3,2

Milieu peptone glucose à pH = 7,6

Jours	Acide libre	Acides aminés totaux	Acides aminés mis en liberté par l'action du bacille	Acides aminés non dégradés par le bacille	Acides aminés employés par le bacille
1	0	30	0	30	0
3	5,3	30	12	17,1	0,9
6	0,7	30	22,6	2,6	4,8
9	0,8	30	24,7	0	5,3
14	0	30	24,6	0	5,4

Milieu peptone à pH = 7,6

1	0	30	0	30	0
3	0,2	30	7,8	21,8	0,4
6	0	30	18,9	9,5	1,6
9	0	30	27,4	0	2,6
14	0	30	27,2	0	2,8

De ces expériences nous pouvons conclure tout d'abord en considérant les acides libres dans les substrats, que dans le milieu peptone-glucose à réaction acide initiale, cette acidité augmente très vite pour rester, après 6 jours de culture, à peu près constante. Dans les deux autres milieux la courbe de réaction augmente aussi dans les 3 premiers jours de culture vers l'acidité. Mais ensuite, par l'attaque de la matière quaternaire, l'alcalinité s'effectue de nouveau très vite dans le milieu et par conséquent le ferment trypsique peut agir d'une façon très prononcée. Ceci devient en effet très apparent dans la 3^{e} colonne de nos tableaux; tandis que dans le milieu initialement acide en présence du sucre, la dégradation de la peptone est très lente et progresse par faibles étapes, nous remarquons que dans les milieux alcalins, le pouvoir protéolytique a dégradé dès le 6^{e} jour de la culture la presque totalité de la peptone.

Quant à l'assimilation même de la bactérie nous pouvons dire que l'apparition du pigment rose ne favorise en rien l'assimilation de matière azotée; au contraire celle-ci est plus prononcée dans le milieu peptone-glucose à pH = 7,6, donc

dans le milieu, où il y a production de la substance chromogène, celle-ci existant à l'état incolore, donc ne pouvant pas intervenir dans le métabolisme assimilateur. Sur milieu de peptone seul, par conséquent en l'absence de substances ternaires spécifiques, le développement de la bactérie est assez bon, et l'assimilation protéique n'est guère moins prononcée que dans le milieu, où la production du colorant atteint son maximum.

Quant à la recherche de la fonction assimilatrice vis-à-vis des hydrates de carbone, nous avons employé notre milieu synthétique F. auquel on a ajouté soit 3 % de glucose, soit 5 % de saccharose. La concentration en ions H des milieux a été fixée pour les uns à pH = 6,4, pour les autres à pH = 7,6. Les milieux ont été stérilisés par une tyndallisation pratiquée pendant 8 jours à une température de + 90° et durant une heure par jour. De plus nous avons suivi cette technique pour les deux milieux à un pH = 7,2 et au moment de l'emploi seulement nous avons ajusté la concentration en ions H au titre voulu, en ajoutant aseptiquement au fur et à mesure soit de l'acide chlorhydrique N/20, soit de la soude N/20.

Ces deux solutions ont été stérilisées au préalable. Ainsi nous avions toutes les garanties de travailler dans des conditions rigoureuses et exactes.

De plus, des milieux témoins non ensemencés ont été préparés et exposés pour chaque expérience aux mêmes conditions que les milieux ensemencés. Ils nous ont servis, premièrement de contrôle de l'asepsie de nos manipulations et secondement à titre de rectificatif en cas de décomposition ou d'interversion des sucres. Les dosages ont été effectués au moyen de la méthode de Bertrand après défécation des milieux avec la solution de Denigés. Les tableaux suivants expriment les résultats obtenus après des cultures de 7, 15, et 21 jours.

Dosage après 7 jours de culture.

Milieux	Concentration en ions H	Coloration de la culture	Sucre initial	Sucre non utilisé	Sucre disparu	Remarque
Glucosé ...	6,4	rose pâle	3 grs.	1,53	1,74	
» ...	7,6	jaune	3	2,11	0,89	
Saccharosé	6,4	rose pâle	5	3,4 interverti spontaném.	1,6	non hydrolysé
Saccharosé	6,4	rose pâle	5	3,42	1,58	hydrolysé
»	7,6	blanc	5	3,98	1,02	non hydrolysé
			5	interverti par le bacille		
»	7.6	blanc	5	4,18	0,82	hydrolysé
Dosage après 15 jours de Culture						
Glucosé ...	6,4	rouge	3	0,9	2,1	
» ...	7,6	jaune	3	2,2	0,8	
Saccharosé	6,4	rouge vineux	5	1,88 interverti spontaném.	3,12	non hydrolysé
»	6.4	rouge vineux	5	1,88	3,12	hydrolysé
»	7,6	blanc crèm.	5	2,7 interverti spontaném.	2,3	non hydrolysé
»	7,6	blanc crèm.	5	3,14	1,86	hydrolysé
Dosage après 21 jours de Culture						
Glucosé ...	6,4	rouge violet	3	0,77	2,23	
» ...	7,6	jaune verdâtr.	3	1,39	1,61	
Saccharosé	6,4	rouge vineux	5	1,7 interverti spontaném.	3,3	non hydrolysé
»	6,4	rouge vineux	5	1,73	3,27	hydrolysé
»	7,6	jaune verdâtr.	5	3,02	1,98	non hydrolysé
»	7,6	»	5	3,15	1,85	hydrolysé

De ces expériences nous nous croyons en droit de conclure, que dans les milieux glucosés et saccharosés de pH = 6,4 c'est-à-dire en présence du pigment rouge, le *Bacillus Citrulli* Sartoryi assimile la quantité la plus élevée en hydrate de carbone.

Ceci n'est nullement étonnant, car nous avons déjà pu démontrer dans l'étude des caractères morphologiques, que le bacille évolue vers une forme *coccobacillaire*, avec une prédisposition très prononcée à former un dépôt abondant dans la profondeur des tubes et à évoluer presque dans les conditions d'un anaérobie. Nous constatons en outre la présence d'une « invertase » dégradant le saccharose, mais malgré cette propriété l'assimilation de ce sucre est beaucoup moins importante que celle du glucose.

Un phénomène à remarquer est de plus l'arrêt presque complet de l'assimilation dans la culture âgée de plus de 15 jours.

TROISIÈME PARTIE

ÉTUDE DE LA SUBSTANCE CHROMOGÈNE

CHAPITRE I.

GÉNÉRALITÉS.

Au cours des recherches effectuées pour l'étude des caractères morphologiques et biologiques de notre bactérie, décrites dans les chapitres antérieurs, nous avons insisté sur les faits suivants :

Dans toutes les cultures, la substance chromogène diffuse dans le milieu, les colonies bactériennes mêmes restent par contre toujours incolores, ou prennent un aspect blanc sale visqueux.

A l'examen microscopique nous n'avons jamais constaté que le pigment siège dans le corps même de la bactérie. Reiner-Muller (127) dans l'étude du pouvoir chromogène de son *Bacterium coelicolor* attache une importance à la présence de corpuscules métachromatiques qu'il a pu mettre en évidence par la coloration de Neisser et ce phénomène détermine l'auteur à classer sa bactérie dans le groupe du bacille de la diphtérie. Ni par la méthode de Neisser, ni par la technique spéciale de Reiner-Muller (chauffage des frottis à + 120° dans une solution de chlorure de calcium et coloration prolongée avec une solution diluée de fuchsine-phéniquée ou le colorant de Sienne) nous n'avons pu mettre en évidence l'existence de ces *granulations* ou de *chloroplastes* dans notre bactérie.

La présence de formations cristallines telles que Lasseur les a obtenues avec son *Bacillus chlororaphis* ou que Molisch a décrites pour les bactéries pourprées, n'a pu être constaté dans les cultures au cours de nos travaux.

Nous avons, selon toutes ces indications, affaire à une substance chromogène qui est facilement soluble dans l'eau et dans les milieux de cultures aqueux.

La bactérie est de toute façon toujours incolore, tandis que le milieu de culture prend souvent une teinte rouge ou violette très intense.

Par conséquent nous nous croyons en droit de conclure que la bacille ne produit pas lui-même le colorant, car si ceci était, le corps bactérien serait lui-même le plus coloré; nous sommes donc obligés d'admettre que l'organisme sécrète une substance incolore, chromogène qui par la suite forme avec des produits intégraux contenus dans les milieux, une combinaison colorée.

Afin de nous rendre compte de l'exactitude de notre manière de voir, nous avons fait l'expérience suivante :

Un milieu de culture coloré par l'ensemencement de notre bactérie en rouge très intense a été filtré à travers une *bougie de Chamberland* (L. 5). Le filtrat ainsi stérilisé, a été divisé en deux parties. En mélangeant dans des boîtes de Pétri chacune de ces portions avec une même quantité de gélatine stérilisée et encore semi-liquide, nous avons obtenu deux milieux vivement colorés en rouge. Une de ces boîtes de Pétri a été ensemencée à l'aide de notre bactérie par le procédé en stries, l'autre est restée stérile et servait de témoin. Le tout a été placé à la température de + 34°, la température limite de coloration étant, comme nous allons le voir, de + 32°.

Nous avons remarqué que déjà, au bout de 24 à 48 heures, les zones du milieu entourant les stries de cultures, commençaient à se décolorer, tandis que sur le milieu stérile témoin, on ne pouvait constater aucune modification dans l'intensité de la coloration; de même les parties éloignées des colonies bactériennes étaient encore colorées à cette période, et la décoloration, commençant au niveau des colonies bactériennes s'effectuait dans ce milieu petit à petit et suivant un sens centrifuge.

Par conséquent à + 34° le *Bacillus citrulli*, détruit le colorant, et ne peut donc pas renfermer un pigment, ou être coloré lui-même.

Ce caractère à lui seul trace une ligne de démarcation très nette entre notre bactérie et celles du groupe du Bacillus Prodigiosus, desquelles elle semblait se rapprocher par le ton de la coloration.

D'autre part cette propriété permettrait de la classer aux abords du groupe du Bacillus Pyocyaneus, mais avec cette différence que lors de nos expériences nous n'avons jamais réussi, malgré nos efforts, à rendre apparente la propriété de produire la fluorescence dans les milieux.

Nous pouvons, d'après ce que nous venons de dire, ranger notre bactérie dans le groupe des *Chromopares* suivant la classification de Beijerinck (128), comprenant les bactéries qui excrètent la matière chromogène à l'état soluble, diffusible dans le milieu ambiant.

CHAPITRE II.

CONDITIONS DE PRODUCTION DU PIGMENT.

PROPRIÉTÉS PHYSIQUES ET CHIMIQUES.

a) Conditions physiques.

Toutes les recherches ont été faites en cultivant notre bactérie sur le milieu synthétique F.

Nous avons déjà vu que l'apparition du pigment, comme celle des toxines bactériennes, dépend très rigoureusement de la réaction du milieu; c'est ainsi qu'à une réaction légèrement alcaline la coloration prend une nuance verte ou jaune, à une réaction légèrement acide nous voyons se former la nuance rouge; si le milieu acide vieillit la teinte se modifie encore vers un ton violet.

Dans une série de milieux nous avons fait varier la concentration en ions H de façon que le pH initial soit successivement de 2,54 3,38 4,24 5,63 6,24 7,68 10,21; nous avons pu constater que la diffusion de la teinte rose était limitée entre les pH initiaux de 4,24 et 6,24. Au-dessus d'un pH = 6,24 jusqu'au pH = 7,68 nous remarquons, suivant les matières ternaires introduites dans les milieux, des colorations jaunes, jaune-verdâtre, ou vertes. Au-dessous du pH = 4,24 et au-dessus du pH = 10,21 nous n'avons pu mettre en évidence la présence d'une substance chromogène. D'autre part, l'apparition de la propriété chromogène est fonction de la température culturale. Les milieux se colorent à la température ordinaire comprise entre + 10° et + 20°; ils se colorent encore à des températures basses, mais le phénomène est peu marqué et inconstant. Les températures optima pour la production des pigments sont situées entre + 20° et + 27°. La température limite optima est de + 32°. Au-dessus de cette température aucune matière chromogène n'a pu être mise en évidence.

Afin de rechercher l'influence de la lumière sur la production de la matière colorante, nous avons classé une série

de tubes au bord d'une fenêtre placée vers l'est, de sorte qu'ils ont été exposés à une lumière solaire assez intense; d'autres tubes ont été disposés dans une lumière diffuse à l'intérieur d'un laboratoire, et un troisième lot de cultures a été hermétiquement enveloppé à l'aide de papier noir épais et placé à l'obscurité complète.

Le colorant s'est formé dans les trois sortes de cultures et en tenant compte de la différence de développement et de la richesse de la culture (le maximum de récolte a été obtenu en lumière diffuse, le minimum en lumière intense) la fonction chromogène est analogue pour les trois sortes de cultures. Par conséquent la lumière n'influe pas sur la production du phénomène de pigmentation.

Influence de l'oxygène sur la fonction chromogène.

Nous avons déjà constaté que la bactérie est une anaérobie facultative. Nous nous sommes demandés si l'*oxygène* pouvait intervenir dans l'apparition ou le *caméléonage* du colorant. Nous avons pensé au phénomène de recoloration à l'air de la culture du *Bacillus pyocyaneus* et ses variétés, ou encore aux sucs de certains champignons qui prennent à l'air une coloration bleue, rouge, violette, verte, rouge ou noire.

En effet les chromogènes bleus du *Boletus cyanescens* Bull. et du *Boletus luridus* Schaeff. verdissent presque instantanément à l'air; ceux du *Boletus pachypus* et du *Boletus calopus* verdissent lentement; ceux du *Psalliota campestris* et *du Lactarius fuligionosus* Fr. rougissent; ceux du *Lactarius uvidus* Fr. et du *Lactarius flavidus* Boud. deviennent violets; ceux du *Psalliota flavescens* Ros. et du *Lactarius scrobiculatus* Scop. deviennent jaunes; ceux du *Psalliota Bernardii* Quel. brunissent et ceux du *Russula nigricans* Bull. deviennent noirs d'après les travaux de Bourquelot et G. Bertrand.

A cet effet nous avons tout d'abord soumis des milieux incolores au jaune-verdâtre à une agitation vive à l'air, mais le résultat de recoloration est resté entièrement négatif. Les autres milieux ont été introduits dans des flacons barboteurs

et nous y avons fait passer un courant d'oxygène pendant plusieurs heures; cette expérience n'a pas donné non plus le résultat attendu. Nous avons alors eu recours à des cultures en anaérobioses stricte, pour constater si dans des milieux privés d'oxygène la fonction chromogène se manifestait encore. Nous avons employé des tubes à vide de Roux dans lesquels nous avons pratiqué au moyen de la trompe à eau un vide correspondant à 70 millimètres de mercure; d'autre part, nous avons cultivé la bactérie dans des tubes doubles d'après la méthode de Buchner en présence de pyrogallate de potassium. Dans ces deux expériences la bactérie s'est développée et les colorants rouges ou verdâtres ont apparu, avec cependant un peu de retard.

Dans une autre expérience au moyen des tubes de Roux dans lesquels nous avons introduit des gaz à l'hydrogène, les milieux sont restés stériles.

Si par ces expériences nous n'avons pu démontrer avec une rigueur définitive la non-intervention absolue de l'oxygène dans le phénomène chromogène, nous nous croyons cependant en droit de conclure, que la bactérie sécrète la substance colorée même dans une atmosphère très pauvre en oxygène, et que d'autre part ce gaz ne joue aucun rôle dans le phénomène de caméléonage.

Essai de séparation du colorant par la méthode capillaire de GOPPELSROEDER, et action fluorescente du colorant sur les rayons lumineux de WOOD.

Dans la première partie de notre travail nous avons exposé les principes et les avantages de la méthode capillaire introduite par Goppelsroeder et permettant de séparer les différents principes des solutions complexes.

Nous avons donc eu recours à cette méthode qui, bien qu'elle ne nous ait pas donné les résultats attendus, nous a quand même fourni des indications utiles. Nous tenons à décrire ces expériences dans ce chapitre traitant les propriétés physiques du colorant sur les filtres.

Nous avons d'abord coupé du papier-filtre n° 598 dans la direction de la longueur des fibres de telle sorte que nous avons obtenu des bandes de 30 centimètres de longueur

et de 2 centimètres ½ de largeur, suivant les principes indiqués par Pfau (129). D'autre part, nous avons préparé des tubes de culture de grandeur appropriée, et sur lesquels nous avons fixé à la partie ouverte une agrafe recourbée. Puis nous avons suspendu les bandes de papier-filtre à l'intérieur des tubes. Le tout a été placé à l'étuve à + 60° pour sécher. Après un séjour de deux jours à l'étuve nous avons introduit avec précaution à une hauteur de 2 cm. ½ le liquide coloré à examiner. Les tubes ont été de nouveau hermétiquement fermés au moyen de gutta-percha et nous les avons abandonnés au repos. Des analyses ont été faites à des températures constantes, à une pression égale, en éliminant les causes d'erreurs qui auraient pu intervenir par les différents degrés hygroscopiques de l'air.

Nous avons ainsi examiné des solutions rouges, des solutions verdâtres et des milieux incolores. Le tableau ci-dessous indique la vitesse de montée des zones colorées notées à différents intervalles et la hauteur terminale et définitive de l'ascension des zones colorées sur le papier-filtre. Il faut faire ressortir ici que la *substance chromogène* produite par le *Bacillus Citrulli* est constituée par un seul et unique colorant, car nous n'avons jamais pu observer des bandes d'ascension séparées de colorant au cours de ces expériences au moyen de trois milieux de cultures.

Nous revenons encore sur la présence d'une seule zone colorée, preuve que notre pigment est formé d'une seule substance, qui est très stable. Dans les milieux verts ainsi que dans les milieux verdâtres nous avons quelquefois pu observer de faibles bandes de zone jaunâtre ou brunâtre, qui doivent être en relation avec des produits de décomposition du milieu, car en manipulant plus tard avec des solutions pures, nous n'avons pu constater ces zones.

Tableau d'ascension des colorants par la méthode de GOPPELSROEDER.

Substratum	Concentration	Période notée après une imbibition de :					
		10'	30'	60'	4 hs	18 hs	24 hs
Milieu rouge	non dilué	8,8	9,1	10,3	14,9	15,0	15 ,1
Milieu verdâtre ..	non dilué	5,1	5,3	5,7	8,3	13,4	13,7
Milieu incolore.....	non dilué	5,4	6,8	10,1	12,7	16,3	16,3
Milieu rouge	dilué 1 /1	10.4	10,8	12,0	16,7	17,4	17,4
Milieu verdâtre ..	dilué 1 /1	5,4	6,9	7,5	14,1	17,2	17,2
Milieu incolore.....	dilué 1 /1	5,5	7,4	11,0	15,9	18,2	18,2
Milieu rouge .	dilué 1 /4	11,2	11,9	12,1	16,7	17,5	17,5
Milieu verdâtre	dilué 1 /4	5,7	7 ,6	9,1	14,4	17,3	17,3
Solution pure rouge à ...	0,01 %	11,8	13,0	13,8	17,5	18,2	18,2
Solution pure verte à	0,01 %	7,6	9,2	10,5	15,1	18,2	18,2

En examinant le tableau ci-dessus on peut se rendre compte que le pigment monte d'autant plus vite sur le papier-filtre que la concentration est moins faible et que la solution est plus pure. Le résultat final de l'ascension peut être considéré comme définitif après 18 heures d'imbibition; le maximum de hauteur est situé à 18,2 cm.

En général les solutions rouges ont une vitesse d'ascension beaucoup plus prononcée que les solutions vertes. La coloration verte atteint le maximum seulement dans la solution pure et dans ce cas la hauteur est identique à la couleur rouge.

Par contre en présence du milieu de culture l'ascension n'atteint jamais le maximum et il semble même exister dans le substratum à des dilutions très grandes, des substances inhibitrices vis-à-vis du pouvoir capillaire.

Dans le milieu incolore, ou nous avons seulement noté la hauteur du liquide aspiré, ces substances retardatrices semblent aussi exister, mais leur influence est moins prédominante.

Nous avons ensuite découpé des bandes de papier-filtre imprégnées pour en séparer les zones qui avaient absorbé les substances chromogènes, et en les traitant avec de l'eau distillée nous avons obtenu des solutions pures du colorant. Ces liquides nous ont servis pour effectuer des réactions chimiques que nous décrirons plus loin et qui ont toujours donné des résultats identiques à ceux obtenus à l'aide du colorant pur obtenu par cristallisation. D'autre part nous avons employé ces solutions et les bandes de papier-filtre pour analyser les propriétés de fluorescence de notre colorant par exposition aux rayons de Wood. Pour cette analyse nous avons employé la lampe à mercure en quartz à grand éclat intrinsèque et munie d'un filtre spécial en verre à l'oxyde de nickel, imaginé par Wood qui laisse passer la raie ultraviolette de 3660 U.A. particulièrement intense. L'appareil est construit par la *Société Gallois et Cie , de Lyon* et se compose essentiellement :

1° d'un brûleur à mercure en quartz très puissant, laissant passer tout le spectre de mercure, à allumage automatique, type Henri George, à 110 Volts et 8 Ampères 5.

2° d'un verre à l'oxyde de nickel n° 150, extrêmement sélectif laissant passer presque uniquement la raie très intense 3660 U. A.

3° d'une enveloppe métallique et d'un réflecteur muni d'un rideau noir, de sorte qu'on peut concentrer très énergiquement les rayons lumineux sur l'objet à analyser en évitant par la protection toutes autres sources lumineuses pouvant induire en erreur.

Nous avons obtenu les résultats suivants :

1° la solution aqueuse de pigment pur obtenu par cristallisation à une concentration de 0,01 % donne une fluorescence violet laiteux; l'intensité lumineuse de cette solution est la plus forte et peut être désignée par comparaison avec les autres solutions par le chiffre 20.

2° la solution alcoolique (C^2H^5OH) à la concentration de 0,01 % est fluorescente surtout à la surface avec une teinte violet laiteux de même, mais l'éclat est beaucoup moins intense et l'intensité peut être exprimée par le chiffre 8. Le solvant a été exposé seul aux mêmes conditions, afin d'éviter les causes d'erreurs provenant d'une fluorescence propre à l'alcool. Ceci a été pratiqué dans toutes les expériences que nous énumérons par la suite, et en cas de besoin nous avons tenu compte de ce phénomène accessoire. La fluorescence de la solution alcoolique à une concentration de 0,005 % devient plus intense et nous avons pu nous rendre compte que l'intensité augmente en rapport direct avec la dilution de la solution jusqu'à 0,0005 % où il semble se produire une déviation de la courbe d'intensité vers la diminution. Le maximum d'intensité peut être désigné par le chiffre 11,5.

3° La solution aqueuse alcaline (Na OH) donne une fluorescence violette, moins intense que la solution aqueuse pure sans réactif, mais le trouble laiteux est beaucoup moins prononcé et la solution irradiée reste limpide et transparente sur une couche de 3,2 centimètres d'épaisseur. L'intensité = 13.

4° La solution acide (HCl) sans chauffage donc non hydrolysée, donne à une concentration de 0,005 % une fluorescence violet laiteux d'une intensité comparable à la solution pure de 0,01 %. Des concentrations plus fortes ou plus faibles que 0,005 font diminuer l'intensité.

5° Les bandes de papier-filtre obtenues par la méthode capillaire sont uniformes et nettement limitées et donnent par une imprégnation au moyen du milieu de culture rouge dilué au quart, une fluorescence violette.

6° Les bandes de papier-filtre imprégnées du pigment en milieu alcalin verdâtre dilué au quart donnent une fluorescence violette uniforme, mais beaucoup moins lumineuse.

7° Les bandes de papier-filtre imprégnées au moyen d'un milieu acide hydrolysé par chauffage sont beaucoup moins fluorescentes et ont une teinte jaune verdâtre.

8° La solution du pigment hydrolysé dissout dans l'alcool amylique à 0,01 % donne une fluorescence beaucoup moins intense (6) et devenant jaune blanchâtre.

9° Les bandes de papier-filtre imprégnées à l'aide d'une solution de pigment hydrolysé dans l'alcool amylique donnent des zones uniformes et nettement limitées, la teinte de la fluorescence est jaune brunâtre et l'intensité est plus forte que celle de la bande trempée dans l'alcool amylique pur.

b) **Conditions chimiques de production du pigment.**

Rôle des matières organiques quaternaires et ternaires.

Nous avons, dans la deuxième partie de ce travail, assez longuement parlé du rôle de la composition du milieu de culture dans l'apparition du pigment.

Nous avons démontré que les subtances quarternaires n'interviennent aucunement dens ce phénomène. Nous avons d'autre part constaté que la végétation de notre organisme et l'attaque de l'asparagine dans notre milieu synthétique F. sont plus actives et plus profondes en présence d'hydrate de carbone, et que la coloration rose ou verte fait son apparition uniquement en présence de ces substances ternaires.

Par passages successifs en milieux dépourvus d'aliments sucrés, la production des substances colorées est considérablement affaiblie. Si on réensemence des souches cultivées pendant plusieurs générations sur des milieux privés de sucre sur milieu sucré, un grand nombre de tubes ensemencés restent invariablement incolores, et sur le petit nombre de tubes qui se colorent, on note une diminution très remarquable de l'intensité de la coloration. C'est seulement après plusieurs passages sur milieux sucrés que la bactérie récupère son pouvoir chromogène initial.

En somme l'aliment hydrocarboné favorise énormément la production des matières colorantes, l'aliment ternaire est rigoureusement indispensable à la réalisation du phénomène chromogène.

Rôle des sels minéraux

Dans leur publication A. et R. Sartory et J.Meyer (130) concluent : « cultivée sur un milieu renfermant un hydrate de carbone, et un phosphate ou sulfate de magnésie en présence de chlorure de sodium la bactérie sécrète une matière colorante. »

Ce caractère rapprocherait notre bactérie du *Bacille pyocyanique* et de beaucoup d'autres bactéries chromogènes telles que *B. prodigiosus, B. rosaceus metalloïdes, B. syncyanus, B. chlororaphis* etc...

Afin de constater ces propriétés nous avons ensemencé une série de tubes avec notre milieu synthétique F. ne contenant cependant pas de sulfate de magnésie. La culture obtenue montrait en effet un développement retardé et la teinte rose a fait son apparition seulement vers le huitième jour. Quand nous repiquons cette culture une deuxième et une troisième fois sur des milieux sans sulfate de magnésie, on constate vers le quatrième jour l'apparition d'un trouble dans le milieu, la bactérie se développe, par conséquent la matière colorante fait encore son apparition vers le huitième jour, mais la coloration devient de plus en plus faible et de plus en plus longue à apparaître par rapport avec le passage progressif sur milieu sans magnésie. Le sulfate de magnésie ne semble donc pas indispensable à la production du colorant, il favorise même à des traces infinitésimales la production du pigment. Des essais analogues ont été faits avec des sels de phosphate, ils ont donné des résultats identiques. La nature du sel ne semble pas jouer un rôle dans la production du pigment, mais la présence de traces de phosphore, soit à l'état organique, soit à l'état de sel minéral, a une action stimulante sur ce phénomène et l'élément phosphore quoique n'étant pas indispensable, favorise cependant le pouvoir chromogène de la bactérie.

Action du fer

Connaissant les travaux importants de Lasseur sur l'exaltation de la fonction chromogène de certaines bactéries par la présence de sels de fer, tels que le sulfate ferreux, le citrate ferreux, le chlorure ferrique, le sulfate de fer ammoniacal, l'alun de fer ammoniacal etc.... et sur la production de substances mères des corps colorés par la présence même de traces de fer, nous avons effectué des cultures sur deux séries de tubes dont une était débarrassée complètement de traces de fer, tandis que l'autre correspondait à notre milieu synthétique F. avec 0,5 de sulfate de fer pour 1000 cc.

Nous avons cultivé les deux souches de bactéries pendant 5 générations sur milieu approprié, mais nous n'avons pu constater ni sur milieu alcalin, ni sur milieu acide, une différence dans la production du pigment. Nous nous croyons donc en droit de conclure que l'élément fer n'intervient pas dans la production et dans l'intensité de la matière chromogène.

c) Propriétés du pigment sur les milieux de culture.

Nature de la coloration

Dans les différents milieux ou nous avons constaté le phénomène de chromogénèse, les teintes observées dans les diverses conditions de culture ont été les suivantes :

1° Milieu glucosé et saccharosé à pH initial de 6,4 : coloration rouge violet comprise entre les numéros 576 et 583 du Code des couleurs de Kliencksieck et Valette, Paris 1908.

2° Milieu glucosé à pH initial de 7,6 : coloration jaune verdâtre compris entre les numéros 202 et 205 du Code des couleurs précédemment cité.

3° Milieu saccharosé à pH initial de 7,6 : coloration orangé-jaune correspondant aux numéros 181 et 182 du même Code des couleurs.

Solubilité

Nous avons vu au cours de ce travail, que le pigment se forme seulement hors du corps bactérien et qu'il diffuse très facilement et fortement dans les subtrats aqueux. Ceci nous indique déjà que le colorant doit être soluble dans l'eau et dans les solvants hydratés. En effet, l'addition au milieu stérilisé et filtré de parties égales de glycérine, d'alcool absolu et d'acétone ou de chlorure de sodium jusqu'à saturation, ne modifie en rien les propriétés du colorant. Le milieu filtré à sa concentration initiale ou réduit de moitié par évaporation, agité en présence d'éther, de chloroforme, d'éther de pétrole, de sulfure de carbone, de tétra-chlorure de carbone, de benzène, de toluène et des matières grasses n'abandonne pas de trace de substance colorante à ces solvants.

Nous nous croyons par conséquent en droit de conclure dès à présent que le *Bacillus Citrulli Sartoryi* est soluble dans l'eau, dans l'alcool dilué, dans l'acétone, dans la glycérine, et qu'il est insoluble dans les autres solvants mentionnés plus haut.

Précipitation

Nous avons alors essayé de précipiter le colorant dans le liquide de culture. La solution concentrée par évaporation a été traitée par une solution d'acétate de plomb tribasique. On obtient des flocons bleu-verdâtre. Par addition d'une solution de sulfate mercurique le milieu clair se trouble lentement et donne un dépôt bleu. En ajoutant au milieu rouge du carbonate de soude, la teinte vire aussi au bleu, mais cette coloration n'est pas stable et passe bientôt au vert-jaunâtre.

Les méthodes de précipitation au moyen d'autres réactifs n'ont donné aucune satisfaction, car la substance chromogène semble très sensible vis-à-vis des réactions chimiques et il nous a paru impossible d'obtenir, sans modification profonde du colotant, un résultat rigoureux.

Action de la Filtration sur les milieux de cultures et sur la substance colorante.

L'action des filtres sur les milieux de culture peut être considérée comme nulle. Le papier LAURENT, le papier n° 598 de SCHLEICHER et SCHULL, les filtres de KITASATO et D'ARSONVAL laissent passer le colorant sans modification aucune de ses différentes nuances. Les bougies de CHAMBERLAND sont traversées par le colorant sans changement, à condition que la concentration en ions H du milieu soit plus grande que 6,20. Au-dessus de cette réaction le liquide rouge passe avec la teinte verdâtre.

Absorption du colorant.

Le colorant ne peut pas être séparé du milieu de culture, par fixation sur du coton ou sur la laine. Le milieu filtré à travers une bougie de talc ou de charbon ou de magnésie calcinée ou de craie, n'abandonne que des traces de colorant à ces substances. La substance colorante est par contre fixée par le chlorure ou le nitrate de sodium. Au cours ne nos travaux nous avons cependant constaté que le colorant peut être

séparé presque complètement du milieu de culture par une filtration à travers une bougie de talc de 20 centimètres de hauteur et de 4 centimètres de diamètre, si on prend la précaution de chauffer au préalable le milieu, en présence de quelques gouttes d'acide acétique concentré, au B. M. jusqu'à réduction au moins de moitié.

CHAPITRE III.

ESSAIS DE SÉPARATION DU COLORANT.

Premier essai de séparation par la méthode capillaire.

(voir précédemment.)

Deuxième essai de séparation par l'action de différents solvants.

Les différents faits mentionnés antérieurement sur les propriétés de solubilité et de précipitation prouvent la grande difficulté que l'on rencontre dans ces conditions pour l'extraction de la matière colorante des milieux de cultures aqueux par voie chimique, difficultés qui n'interviennent pas dans l'étude des *bactéries* du groupe *prodigiosus* ou des *cocci chromogènes*.

Après avoir vainement essayé d'aboutir à un résultat définitif à l'aide de la méthode purement chimique de THUMM et de la technique de LASSEUR, indiquées dans la première partie de notre exposé, nous avons obtenu un premier résultat plus satisfaisant par le mode opératoire suivant :

Après stérilisation des milieux de cultures liquides (qui n'altère en rien le pigment) nous avons filtré à travers une colonne de talc. Le filtrat clair a été évaporé dans le vide; le résidu est repris par de l'alcool à 80 °, filtré sur filtre de JENA (N° 3 G 3) évaporé dans le vide à nouveau, repris par de l'alcool à 96 °, filtré sur filtre de JENA évaporé et repris par un mélange alcool acétone pur à ½. La solution ainsi obtenue a été divisée en deux parties après filtration. L'une a été examinée telle qu'elle, l'autre a été évaporée dans le vide jusqu'à réduction au tiers de son volume, nous y avons ajouté son volume de toluène. A l'aide de cette manipulation nous avons obtenu une pellicule brun violet, qui nage à la surface du liquide.

Après filtration cette substance ne se dissout plus ni dans l'acétone, ni dans l'alcool, mais très facilement dans l'eau distillée. C'est ce produit que nous avons utilisé au cours de nos recherches ionométriques avec nos milieux de cultures colorés.

Troisième essai de séparation du pigment.

Purification et caractérisation du colorant par cristallisation.

Trois réactions importantes nous ont frappé au cours de nos travaux et ont dirigé nos investigations vers la bonne voie. Ce sont les suivantes :

1° La possibilité d'absorber le colorant par une colonne de talc, après chauffage prolongé au B. M. en présence de quelques gouttes d'acide acétique cristallisable.

2° L'action d'une solution de carbonate de soude sur la solution rouge, occasionnant un virage au bleu passant au jaune, et dans des conditions données, possibilité de réversion de ce phénomène par addition d'un acide.

3° La réaction de précipitation au moyen de l'acétate basique de plomb, produisant des flocons bleuâtres.

Ces trois phénomènes semblaient en effet rapprocher notre pigment des anthocyanes, et nous savions que WEIGERT (131) et WILLSTÆTTER (132) ont tenté de diviser ces pigments d'après ces caractères en divers groupes :

a) les anthocyanes qui sont rouge en solution acide; en présence de carbonate de soude bleus; et précipitent en bleu par le carbonate de plomb. Le colorant est facilement sujet à une isomérisation à l'état incolore (rose, bleuet).

b) les anthocyanes qui sont rouges en solution acide; en présence de carbonate de soude bleus; et précipitent en bleu par le carbonate de plomb. Le colorant est très stable et ne se décolore que difficilement (vigne, myrtille).

c) les anthocyanes qui sont jaune-rougeâtre en solution acide; en présence de carbonate de soude bleus; et qui donnent avec l'acétate de plomb un précipité rouge (radis);

d) les anthocyanes qui sont jaune-rouge, ou bleu-rouge en solution acide; en présence de carbonate de soude violets; et incolores à l'état d'isomérisation (pavot, pélargonium);

e) les anthocyanes qui sont rouges en solution acide; qui en présence de carbonate de soude et observés en couche épaisse sont rouges, observés en couche mince vert-bleu, ou rouge-violet, ou brun-rouge (œillet, aster);

f) les anthocyanes qui sont violets en solution acide, rouges en présence de carbonate de soude et précipitent en rouge par l'acétate de plomb (betterave rouge).

Nous avons donc par la suite essayé de caractériser et d'isoler le colorant de notre substratum aqueux par la réaction des anthocyanidines d'ERDMANN (133) interprétée et mise au point par WILLSTÆTTER (134).

Le milieu de culture stérilisé est concentré en présence d'acide acétique, puis centrifugé et filtré. Le filtrat est mélangé avec du talc, avec lequel on prépare une bougie de 30 centimètres de hauteur et de 4 centimètres de diamètre. Le colorant est retiré de cette pâte introduite dans la bougie, au moyen d'alcool à 75 ° à chaud (+ 80 °). La solution ainsi obtenue est alors agitée au moyen d'alcool amylique, de façon à occasionner une séparation des liquides alcooliques et aqueux. La couche inférieure aqueuse renferme dans ces conditions tout le colorant. Après décantation on précipite cette solution aqueuse par l'alcool absolu, on sépare ainsi une forte proportion de *pentosanes* contenus dans le liquide. Le filtrat rouge pur est hydrolysé au B. M. pendant 3/4 d'heure en présence d'acide sulfurique à 7 %. Cette solution est ensuite agitée au moyen d'alcool amylique après neutralisation. Le colorant passe dans l'alcool amylique ; celui est lavé à plusieurs reprises avec de l'eau distillée sans que celle-ci se colore. La solution amylique est évaporée et on obtient une masse amorphe, fortement colorée en jaune vert. La réaction d'ERDMANN caractéristique pour les glucosides a été par conséquent positive.

Nous avons, d'autre part, effectué la technique suivante : 5 litres de culture stérilisés et concentrés en présence d'acide acétique, sont mélangés avec du talc, puis à cette pâte nous ajoutons peu à peu 6 centimètres cubes d'acide sulfurique à 4 % renfermant 10 % d'alcool à 90°. La pâte semi-liquide rouge est introduite dans un tube de centrifugeuse (JOUAN). Nous centrifugeons et nous obtenons un liquide surnageant coloré en rouge vif ; le culot de talc est devenu rose pâle. Nous décantons cette solution alcoolo-aqueuse-acide et l'introduisons dans une ampoule à décantation en présence de 10 centimètres cubes d'alcool amylique. On agite vivement. La couche alcoolique se séparant après repos est colorée en rouge (à cause de la présence d'acide). Nous la séparons et nous la lavons dans une autre ampoule à décantation avec une solution aqueuse d'acétate de sodium à 5 %. Le liquide de lavage enlève tout le colorant et l'alcool amylique devient presque incolore. La solution aqueuse est ensuite concentrée

dans le vide au tiers de son volume. A ce liquide concentré nous ajoutons à froid une solution aqueuse concentrée d'acide picrique jusqu'à ce que le liquide devienne légèrement trouble. On chauffe avec précaution pour faire disparaître ce trouble et on laisse cristalliser par le repos le picrate qui donne des prismes hexagonaux colorés très intensément en rouge (fig. I).

Par transformation au moyen d'un courant sec d'acide chlorhydrique ou sulfurique gazeux, dégagé dans la solution de picrate, on obtient des solutions de chlorhydrates ou de sulfates, précipitables par un mélange éther-éther de pétrole et cristallisables dans une solution alcoolo-aqueuse chlorhydrique ou sulfurique à 5 %. Le sulfate se cristallise sous forme d'aiguilles colorées en brun rougeâtre (fig. II), le chlorhydrate sous forme de plaquettes prismatiques vert-bouteille.

Propriétés physiques du chlorhydrate.

Ce sel est inodore, il possède une saveur astringeante rappelant faiblement celle du tanin, mais d'une intensité beaucoup moins prononcée.

Le chlorhydrate cristallisé dans l'eau-alcool est hydraté. Il perd son eau de cristallisation sans subir d'altération à + 105 ° dans le vide.

	0,158 gr.	ont perdu	0,0112 d'eau
	0,185	—	0,0132 —
soit en moyenne	0,1715	—	0,0122 —

La perte en eau s'élève par conséquent à environ 7 % de son poids. Par simple exposition à l'air, le sel ainsi déshydraté reprend très vite son eau de cristallisation. Par une exposition prolongée le sel devient hygroscopique. Chauffé progressivement dans un tube étiré il fond à + 215 ° — + 218 ° en brunissant et en dégageant des bulles de gaz. Chauffé au bloc MAQUENNE le chlorhydrate fond instantanément à + 224 ° donnant un liquide brunâtre qui dégage une odeur de phénol et qui finalement devenant noir, charbonne en donnant une odeur de sucre brûlé.

La détermination du pouvoir rotatoire a donné des résultats négatifs. L'essai a été effectué sur une solution aqueuse renfermant 0,0151 de chlorhydrate cristallisé pour

100 centimètres cubes. En solution alcoolique à 0,0034 % le résultat était le même. Les deux solutions étant colorées nous avons dû opérer au tube de un décimètre.

Le chlorhydrate est très soluble dans l'eau ordinaire; il est plus difficilement soluble dans l'eau distillée pure, dans l'alcool à 90 ° à froid, dans l'acétone. Il est insoluble dans le chloroforme et le benzène. Dans l'eau de robinet le sel se dissout en donnant une coloration violette, probablement par transformation en sels calcaires. En solution aqueuse acide à froid, la teinte est très stable à la lumière et à l'obscurité. En solution neutre ou alcaline il y a décoloration rapide; par acidification la coloration réapparaît de nouveau.

Propriétés chimiques du chlorhydrate.

La solution du sel chlorhydraté précipite par l'acétate neutre de plomb en donnant des flocons bleu-verdâtre. Le sel est complètement éliminé de la solution. Le précipité plombique, bien lavé et délayé dans l'eau, est décomposé par l'hydrogène sulfuré. On filtre à chaud pour séparer le sulfure de plomb; puis on obtient une solution verte précipitable par l'alcool ou l'éther. La solution de chlorhydrate additionnée d'une trace de chlorure de fer donne une virage violet; de fortes proportions de chlorure de fer occasionnent une décoloration jaunâtre avec altération probable du colorant.

Le chlorure de zinc et le chlorhydrate sodé d'étain produisent une précipitation violette. Le chlorhydrate de notre sel est réduit par le zinc et l'acide acétique et par le bisulfite de sodium.

CHAPITRE IV.

CARACTÉRISATION ET CONSTITUTION DU COLORANT.

Analyse élémentaire.

Le chlorhydrate anthocyanique chauffé dans un creuset en présence de sodium, émet des vapeurs à odeur de phénol.

Le charbon, repris par l'eau, donne une solution ne contenant pas de cyanure : le produit n'est donc pas azoté. Le dosage du carbone et de l'hydrogène a été effectué au tube ouvert dans un double courant d'oxygène. Nous avons employé le sel désséché à poids constant dans le vide à + 105 °.

Nous avons obtenu les résultats suivants indiquant la moyenne des deux expériences :

0,223 gr de produit anhydre ont fourni 0,103 gr. d'H^2O,

0,223 gr. de produit anhydre ont fourni 0,409 gr. de CO^2,

par conséquent :

1 gr. de produit fournirait :

0,465 gr. d'eau et 1,833 gr. de CO^2

donc : H = 5,178 % et
C = 50 %.

Le poids moléculaire a été déterminé par la cryoscopie, au moyen d'une solution renfermant 0,01 % de colorant.

Le poids moléculaire a été trouvé :

$$\frac{185.000}{23} = 804,35$$

Sachant que nous avons affaire à un anthocyane, nous avons alors mélangé à volumes égaux une solution aqueuse de notre chlorhydrate anthocyanique anhydre à 1 % et une solutions d'acide sulfurique à 6 %. Nous avons fait l'hydrolyse en

tube scellé au B. M. bouillant pendant une heure. Le sel se dissolvait très vite dans la solution sulfurique. Après 10 minutes de chauffage la solution est complètement limpide. En retirant du B. M.nous voyons se former, le tube étant encore chaud, des cristaux en forme d'aiguilles allongées très fines. La précipitation étant définitive nous avons filtré le liquide froid sur filtre de JENA, les cristaux ont été mis de côté pour un examen ultérieur, et le filtrat clair nous a servi pour caractériser les sucres.

Le dosage a été effectué par la méthode de BERTRAND, et nous avons trouvé pour deux expériences pratiquées :

1° au moyen de 0,214 gr. de chlorhydrate anh. 0,1453 gr.

2° au moyen de 0,197 gr. de chlorhydrate anh. 0,1340 gr. exprimé en glucose;

3° Moyenne pour 100 gr. : 68.07 %.

D'autre part, une partie de cette solution filtrée a été mélangée avec 0,5 gramme d'acétate de soude et 0,25 gramme de chlorhydrate de phénylhydrazine; le tout chauffé pendant deux heures au bain-marie a donné un précipité, qui cristallisé dans 15 centimètres cubes d'alcool à 50 °, a présenté les caractères des *glucosazones*.

Nous voyons donc que notre colorant doit rentrer dans le groupe des *glucosides*. Le glucose a été libéré de cette solution par l'hydrolyse. Ceci est d'autant plus probable que nous avions dans notre milieu initial de culture du glucose comme matière ternaire et des ions Na comme sels minéraux.

Nous avons ensuite étudié les cristaux obtenus précédemment, ainsi que le produit d'hydrolyse obtenu en partant du milieu de culture et séparé par l'agitation avec l'alcool amylique. La solution évaporée nous a fourni une masse amorphe jaune verdâtre, que nous avons utilisée pour des expériences comparatives.

La détermination du poids moléculaire nous a donné des difficultés que nous n'avons pu vaincre.

La *cryoscopie* est impossible à effectuer dans l'eau et dans l'acide acétique par suite de l'insolubilité de notre substance.

Nous avons essayé d'en déterminer le poids moléculaire au moyen d'un dosage alcalinimétrique. Mais le dosage alcalinimétrique est impossible à effectuer à cause de la colo-

ration verte de la substance, coloration qui empêche de voir le virage de la phénolphtaléine. Nous nous sommes donc contentés de doser par l'analyse élémentaire le pourcentage des éléments de ce corps. Le chlorhydrate anthocyanidique de notre substance a été déshydraté dans le vide à + 105°. Il devient par cette manipulation brun foncé et très hygroscopique.

0,202 gr. de substance ont perdu à 105° 0,0087 gr.
0,10 gr. de produit anhydre ont fourni 0,214 gr. de CO^2.
0,10 gr. de produit anhydre ont fourni 0,0336 gr. de H^2O.

Par conséquent :

H = 3,63 %
C = 58,35 %
Cl = 10,48 %

le tableau suivant exprime les chiffres correspondants pour les *cyanidines* isolées et préparées synthétiquement.

	$C^{15}H^{11}O^5$ Cl. Pélargonidine	$C^{15}H^5O^6$ Cl. Cyanidine	$C^{17}H^{15}O^7$ Cl. Oenidine	$C^{15}H^{11}O^7$ Cl. Delphinidine
C	58,72	55,81	55,66	53,17
H.....	3,62	3,41	4,09	3,25
Cl	10,93	11,01	9,68	10,48

Nous voyons, en comparant ces chiffres avec les résultats obtenus par nous, que le corps que nous avons isolé doit être identique à la *pélargonidine :*

	trouvé	Calculé pour $C^{15}H^{11}O^5$ Cl = 306,5
C %.....	58,35	58,72
H %.....	3,63	3,62
Cl %.....	10,48	10,93

Ayant constaté que le poids moléculaire pour le *chlorhydrate cyanique* est de 804,35 et que la quantité de glucose renfermée dans ce sel est de 68,07 % la formule globale de notre produit doit donc correspondre à :

$C^{33}H^{40}O^{20}$, $3H^2O$ donnant par hydrolyse : $C^{15}H^{11}O^5$ Cl + $3C^6H^{12}O^6$.

P. M. pour $C^{33}H^{40}O^{20}$, $3H^2O$ = 810 renfermant 6,66 % de son poids en eau.

P. M. pour $C^{33}H^{41}O^{20}Cl$ = 792,5 :

	calculé	trouvé
C %	49,96	50 %
H %	5,173	5,178 %

Nous voyons que ces chiffres sont très semblables et notre bactérie semble fabriquer un produit correspondant à la formule :

$$C^{33}H^{41}O^{20}Cl.$$

En effet les cristaux isolés après l'hydrolyse ont des propriétés analogues à la pélargonidine. Les cristaux présentent sous le microscope la forme en *aiguilles allongées* colorées légèrement en jaune, avec une crête violette facilement observable au moyen d'une lumière légèrement diaphragmée (Fig. III).

Ces cristaux sont facilement solubles dans l'alcool absolu et alcool amylique. Ils sont insolubles dans les acides minéraux, dans l'éther, le chloroforme, le sulfure et le tétrachlorure de carbone.

Le colorant se forme dans le milieu à l'état de sel basique d'un glucoside; ces constatations obtenues par voie chimique sont appuyées par nos observations antérieures suivant lesquelles la substance chromogène se produit seulement dans les milieux renfermant des hydrates de carbone en présence d'ions sodium ou potassium.

Nos cultures ont montré d'autre part que la substance chromogène n'exige pour sa formation que des traces d'oxygène. En présence de traces d'alun de potasse, le pigment vire vers le violet.

Le colorant en solution aqueuse (sel chlorhydrique ou sulfurique) est violet; en solution alcoolique rouge; la solution aqueuse légèrement acide est rouge lie de vin; en présence d'alcalis, nettement violette; le produit d'hydrolyse vert colore une solution alcoolo-aqueuse en jaune; la couleur de la couche anhydrique après hydrolyse est violet-bleuâtre.

Toutes ces réactions semblent démontrer nettement que *notre colorant est un glucoside du groupe des anthocyanes*

caractérisés par Combes (135), Willstaetter (136) et son école; il est hydrolysable par action prolongée et surtout par la chaleur en glucose et anthocyanidine qui est insoluble dans l'eau et passe dans l'alcool amylique (réaction d'Erdmann).

Analyse ionométrique

Ayant constaté lors de l'étude sur les caractères culturaux de notre bactérie, que l'apparition de la substance chromogène est conditionnée par la température et par la concentration initiale en ions H du milieu, qu'il devait donc exister un rapport direct entre le phénomène chromogène et ces deux facteurs, nous avons pensé utile d'examiner ces influences au moyen du produit colorant pur. Nous nous sommes servis, vu les grandes difficultés de préparer le colorant à l'état cristallisé et des quantités minimes résultant de cette technique, de la méthode de purification indiquée dans le deuxième chapitre, du deuxième essai de purification.

En vue de l'étude des propriétés de virage sous l'influence de la variation de la concentration en ions H, nous avons eu recours à la méthode suivante :

Nous avons préparé une échelle de tampons à l'aide du potentiomètre à électrode d'antimoine de pH : 1,93 2,93 3,53 3,85 4,48 4,89 5,46 5,93 6,43 7,33 10,84.

De plus, nous étant rendu compte de l'influence de la température quant à la production du phénomène chromogène, nous avons effectué des expériences à différentes températures (+10° +18° +35° +45° +55° +70° +90°).

Des tubes contenant 5 cc. de tampon et respectivement 5 gouttes ou 2 cc. de milieu coloré ou de matière colorante purifiée en solution aqueuse ont été placés dans des thermostats réglés aux différentes températures ci-dessus mentionnées; on a ainsi pu constater que le virage est fonction de la température et du temps de séjour à cette température donnée.

Les tableaux qui suivent expriment les résultats de ces expériences (les + = coloration; les — = décoloration).

I. Séjour de 10' aux températures de .....

t°	pH de :										
	1,93	2,96	3,53	3,85	4,48	4,89	5,46	5,93	6,43	7,33	10,84
90°	—	+	+	+	+	+	+	—	—	—	—
70°	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
55°	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
45°	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
35°	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
18°	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10°	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

II. Séjour de 20' aux températures de

	1,93	2,96	3,53	3,85	4,48	4,89	5,46	5,93	6,43	7,33	10,84
90°	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—	—
70°	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—	—
55°	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
45°	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
35°	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
18°	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
10°	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

III. Séjour de 60' aux températures de

	1,93	2,96	3,53	3,85	4,48	4,89	5,46	5,93	6,43	7,33	10,84
90°	—	—	+	+	+	+	—	—	—	—	—
70°	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—	—
55°	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—	—
45°	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
35°	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
18°	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
10°	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

IV. Séjour de 120' aux températures de

	1,93	2,96	3,53	3,85	4,48	4,89	5,46	5,93	6,43	7,33	10,84
90°	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
70°	—	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—
55°	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—	—
45°	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
35°	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
18°	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
10°	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—

V. Séjour de 180' aux températures de

	1,93	2,96	3,53	3,85	4,48	4,89	5,46	5,93	6,43	7,33	10,84
90°	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
70°	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—
55°	—	—	—	+	+	+	+	+	—	—	—
45°	—	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—
35°	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
18°	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
10°	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Nous avons essayé d'exprimer les résultats obtenus dans le tableau ci-dessous :

t°	temps	pH. 1,93	2,96	3,53	3,85	4,48	4,89	5,46	5,93	6,43	7,33	10,84
90°	60'	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
90°	30'	—	—	—	—	—	+	+	+	—	—	—
70°	120'	—	—	—	—	—	—	+	+	—	—	—
70°	60'	—	—	+	+	+	+	+	+	—	—	—
55°	120'	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—
55°	60'	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
45°	120'	—	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—
35°	120'	—	+	+	+	+	+	+	+	+	—	—
18°	180'	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
18°	120'	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—
10°		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Pour les réactions effectuées au moyen de milieu de culture, la décoloration complète se produit déjà à + 68° après un passage de 60' au thermostat. Mais déjà à la température de + 55° les zones limite de décoloration sont restées définitivement fixées au pH = 1,93 et au pH = 6,43.

Nous voyons donc que le virage peut être défini par une courbe qui est fonction du pH, de la température et de la durée du séjour à une température donnée. Tandis qu'à + 5° toute la série des tampons comprise entre les pH 1,93 et 10,84 reste colorée en rouge, un séjour de une heure à + 90° amène la décoloration dans toute la série. En nous reportant au tableau précédent nous pouvons nous rendre

compte que les pH de 2,96 à 5,93 sont les moins influencés par la température et leur virage dépend principalement de la concentration en ions H. En effet le sommet de la courbe se trouve au pH = 5,46 environ; nous avons pu constater en outre que les liquides colorés de pH = 5,93, décolorés sous l'influence de la température ont repris leur teinte rouge par refroidissement, tandis que les tampons de pH supérieur à 5,93 sont restés définitivement incolores; la réaction de virage peut se faire dans les deux sens en augmentant ou en diminuant la concentration en ions H. Cette opération s'effectue le plus brusquement dans les limites de température comprises entre + 55° et + 70°. Dans ces conditions la concentration limite nécessaire pour la production du virage est réalisée pour un pH = environ 6,3.

D'un autre côté il existe une zone limite acide pour laquelle le pH joue un rôle principal. Au pH = 1,93 il se produit une décoloration constante sauf à une température inférieure à + 10°. Dans ce cas aussi le colorant ne subit pas de modifications : en augmentant la concentration en ions H on arrive toujours, en égard avec la température à obtenir le virage; dans ce cas les limites de températures supérieures et inférieures pour lesquelles la décoloration se produit, sont très éloignées l'une de l'autre. Ces caractères viennent encore appuyer les résultats constatés antérieurement et nous montrent que nous avons affaire à un dérivé anthocyanique. Car nous savons depuis les travaux de Willstaetter que ces corps sont des dérivés du *phényl-benzopyroxonium*, ou *pyrylium*. « Celui-ci existe sous deux formes, dont l'une donne des dérivés incolores, l'autre fournissant des sels colorés. On admet que cette seconde forme diffère de la première par la place de la double liaison qui ne se trouve plus entre les deux carbones centraux, mais entre les deux sommets 2 et 3. Les sels des *dérivés hydroxylés* du *pyrylium* sont en général rouges; les dérivés dans lesquels l'hydrogène d'un OH est substitué par un métal sont bleus; enfin on a des composés violets par l'union de l'oxygène de OH avec l'oxygène basique.» (Thomas (137), cours de chimie biologique II, 1929, p. 307).

Nous avons vu au cours de notre travail que les quatre modifications du colorant peuvent faire leur apparition dans les milieux de culture, suivant leur différente composition et les conditions auquelles ils sont exposés.

Analyse spectroscopique

Les recherches spectroscopiques ont été pratiquées au moyen de plusieurs liquides de concentration différente :

1° Avec le bouillon de culture stérilisé et filtré à un pH = 6,24;

2° Avec la substance purifiée à l'aide de l'extraction par l'alcool-acétone à une concentration de 200 millièmes de milligramme et un pH = 4,24 en solution aqueuse.

3° Avec la substance cristallisée à l'état de sulfate d'anthocyane. On a fait une solution aqueuse à la concentration de 200 millièmes de milligramme et le pH de cette solution était de 5,44.

4° Avec la substance cristallisée à l'état de chlorhydrate d'anthocyanidine dans une solution alcoolique à une concentration de 200 millièmes de milligramme et un pH de 7,2.

Tous ces examens ont été pratiqués sous une épaisseur de 15 mm. et à la température de + 18° aux moyens de sels cristallisés à la concentration et aux pH indiqués ci-dessus.

a) La première solution nous a donnée une bande d'absorption très intense qui s'étend entre $\lambda = 588$ et $\lambda = 543$ avec un maximum pour $\lambda = 563$.

Une deuxième bande d'absorption moins intense s'étend de $\lambda = 513$ à $\lambda = 489$, son maximum est à 510. La zone intercalaire éclarée à son maximum d'intensité pour $\lambda = 533$.

b) En ce qui concerne le deuxième cas, les deux bandes d'absorption sont situées la première entre $\lambda = 582$ et $\lambda = 543$; la seconde entre 513 et 492. Leurs maxima sont $\lambda = 563$ et $\lambda = 507$. L'axe de la plage intercalaire éclairée est situé à $\lambda = 528$.

c) Dans le troisième cas où nous avons affaire à de la substance cristallisée pure, nous avons pu noter deux bandes d'absorption situées entre $\lambda = 582 - 552$ et $\lambda = 513 - 495$.

Leurs maxima d'intensité se trouvent à $\lambda = 566$ et $\lambda = 509$. Le maximum d'intensité de la plage lumineuse intercalaire est à $\lambda = 528$.

d) Dans le quatrième cas concernant le sel anthocyanidique, nous avons constaté une déviation vers le rouge avec une bande très large située entre $\lambda = 568$ et $\lambda = 478$. Cette zone montre deux maxima dont l'un est situé à λ

= 550 et l'autre à λ = 500. Une deuxième bande d'absorption commence à λ = 438 et ici l'intensité diminue progressivement jusqu'à disparition complète.

Ainsi des variations d'intensité de deux unités de pH (pH = 6,24 à pH = 4,24) ont pour effet de faire varier d'une manière insignifiante les places des bandes d'absorption.

En outre, le substrat de dissolution de notre colorant ne semble pas avoir une grande importance pour la caractérisation spectroscopique, car nous obtenons des résultats très comparables en employant trois milieux colorés de composition très variable et renfermant la substance chromogène à l'état naturel, à l'état amorphe, ou à l'état cristallisé.

Quant au *spectrogramme* du *sel anthocyanidique* nous constatons une grande analogie avec celui de la pélargonidine indiqué par WILLSTAETTER et ZECHMEISTER. Les différences observées dans les valeurs peuvent être en rapport avec l'épaisseur des couches et la concentration en ions H des solutions et considérées comme de l'ordre de grandeur des erreurs expérimentales.

Analyse biologique.

Après avoir ainsi constaté la nature du pigment produit en présence de glucose par notre bactérie, nous avons étudié l'influence des autres hydrates de carbone sur ce phénomène; ces matières ternaires ont été introduites seules ou combinées avec d'autres substances, occasionnant des modifications sur les dérivés des anthocyanes.

Ainsi des milieux de saccharose donnent ordinairement des teintes roses et jaunes. Le résultat est identique pour le maltose. En présence d'amidon de blé ou d'amidon de pomme de terre nous obtenons des teintes plutôt violettes. Si on ajoute à ces milieux des traces d'alun de potasse, on obtient des colorations rouges ou le substrat reste incolore.

D'autre part, les milieux filtrés deviennent nettement rouges par addition avec précaution d'acide chlorhydrique, d'acide sulfurique et d'acide acétique. Par addition d'alcalis cette teinte vire à froid ou par un léger chauffage, au vert. Cette teinte n'est plus stable et le milieu se décolore après un certain temps.

L'addition d'alun de potasse, de chlorure de lithium, de nitrate de potassium, de chlorure de strontium, produit de même une coloration rouge intense et très stable.

Par addition d'alcalis on obtient d'abord une teinte verte qui, si l'on augmente la concentration, devient jaune. La couleur verte peut être ramenée au rose par addition d'acide, mais la coloration jaune ne peut plus être modifiée. La coloration verte apparaît aussi en présence de borate de soude, de tartrate neutre de potassium et d'acétate de plomb tribasique, à une faible concentration.

Des solutions colorées saturées avec du chlorure de sodium, nitrate de sodium, ou chlorure de baryum sont très stables, et gardent leur coloration invariablement.

D'autre part, afin de contrôler aussi la différence de notre substance chromogène avec des toxines bactériennes, nous avons effectué des expériences sur des animaux de laboratoire. 10 cc. de solution concentrée de la substance chromogène purifiée par extraction à l'alcool-acétone ont été inoculés par voie intrapéritonéale à un *cobaye* et 5 cc. de la même solution injectés par voie sous-cutanée à une *souris*. Les animaux n'ont montré aucun symptôme d'intoxication.

Un lapin a été, d'un autre côté, inoculé dans la veine auriculaire à différentes reprises pour observer les phénomèes d'anaphylaxie. Le résultat a été négatif. 20 cc. du sang de ce lapin ainsi préparé ont été retirés par ponction au cœur. Ce sang a été mélangé avec parties égales de solution du colorant. Nous n'avons pu constater ni précipitation, ni *lyse* des globules, *notre colorant n'est donc pas un antigène.*

Nous croyons ainsi, par l'analyse chimique, spectroscopique et biologique avoir pu démontrer la nature anthocyanique de notre matière chromogène.

Ces faits nous paraissent d'autant plus intéressants qu'à notre connaissance la littérature biologique ne signale que deux cas : celui de Reiner-Muller, décrit en détail dans notre premier chapitre, et celui de Lehmann où fut mis en évidence la production d'un pigment sécrété par deux bactéries (*Bacillus cœlicolor* et *Bacterium anthocyaneum)* pigment rentrant dans le groupe des anthocyanines, qui sont des colorants végétaux. Notons également que, comme nous, les auteurs ont isolé en même temps que la bactérie, un champignon inférieur rose qui vivait commensalement

sur le même substrat, ou la même plante parasitée. Ce champignon devient par la suite, en culture pure, incolore, et nous nous demandons s'il ne produit pas une excitation spécifique sur la bactérie, influençant la production du pigment végétal ?

Il nous reste à envisager la question suivante : Par quel moyen la bactérie arrive-t-elle à produire un corps dont la structure est assez compliquée, malgré que sa synthèse est encore facilement réalisable ?

En effet, nous pouvons préparer ces *dérivés anthocyaniques* par simple condensation de l'*aldéhyde salicylique* avec l'*acétophénone* pour obtenir en présence d'acide chlorhydrique le *phénylbenzopyroxonium*. Les divers sels glucosidiques de l'*oxypyrylium* constituent alors les *anthocyanes*.

Zechmeister a réalisé la synthèse de la pélargonidine en partant d'un halogène *arylé* du magnésium combiné à la *coumarine*. Nous avons donc essayé d'augmenter le pouvoir chromogène en ajoutant de la coumarine à notre milieu synthétique F., à des doses variables. Mais le résultat n'était aucunement modifié et nous n'avons pas pu constater une augmentation dans la production du colorant.

Nous n'avons donc pas réussi a élucider cette question qui nous aurait permis d'éclaircir les phénomènes présidant au mécanisme de synthèse biologique et de déterminer le pouvoir constructeur du métabolisme bactérien en ce qui concerne la formation de la matière chromogène.

Toujours est-il que grâce à cette substance chromogène glucosidique, la bactérie peut couvrir ses besoins *énergétiques* dans un milieu acide et dépourvu de substance quaternaire organique.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

De l'ensemble de nos recherches nous pouvons donner les conclusions suivantes :

1° Nous avons pu isoler sur différentes espèces de cucurbitacées un *organisme bactérien nouveau à propriété chromogène*, qui vivait en symbiose avec un champignon inférieur, agent primaire de l'infection. En effet, nous avons démontré au cours de notre travail que la maladie bactérienne ne pouvait se développer et évoluer sur les plantes qu'après lésion mécanique ou infection préliminaire mycosique de la membrane cellulosique des fruits.

La maladie que nous avons étudiée ne présente aucun des caractères spécifiques mentionnés dans la littérature phytopathologique; elle ne peut être comparée avec des mycoses pures telles que les anthracnoses, les nuilles, décrites magistralement par J. DUFRENOY et par PRUNET. D'autre part, elle ne peut pas non plus être classée dans le groupe des maladies de nature bactérienne proprement dite des cucurbitacées telles qu'elles ont été décrites par NICOLAS et AGGÉRY et DOOLITTLE (mosaïques).

2° La *Bacillus Citrulli* SARTORYI présente les caractères morphologiques suivants : *bâtonnets* droits ou légèrement arqués, à pôles opposés, le plus souvent arrondis, mesurant de 0 μ, 3 à 4 μ, 5 en longueur, et de 0 μ, 28 à 0 μ, 52 en largeur. Dans certaines conditions telles qu'en culture sur milieux sucrés ou dans des cultures âgées, le bacille se présente sous forme de *bâtonnets* très courts *coccobacillaires* ou même de coccis mesurant de 0 μ, 3 à 1 μ,2 en longueur et de 0 μ,25 à 1 μ, en largeur.

Le *Bacillus Citrulli* SARTORYI est pourvu de *cils péritriches*; il peut s'entourer d'une *gaîne mucilagineuse* simulant une pseudocapsule pour laquelle nous avons démontré la dissemblance avec la capsule proprement dite du pneumocoque. Notre bactérie ne reste pas colorée par la méthode

de GRAM; il est en *anaérobie facultatif* et ne produit pas de spores endogènes. Il se colore facilement par les couleurs d'aniline usuelles.

3° Ce bacille présente les *propriétés biologiques* suivantes : son optimum cultural est compris entre + 18° et + 25°. La courbe de température doit avoir son point culminant à + 22° sur un milieu ajusté à un pH optimum de 7,3. En ce qui concerne la production du pigment, le phénomène se manifeste avec le plus d'intensité pour un pH = à 6,4. Il exige, pour apparaître, la présence d'hydrate de carbone et d'ions sodium ou potassium, dans les milieux de culture. Les limites de température permettant encore la poussée du bacille doivent être fixées à + 8° d'un côté et + 37° de l'autre. En aucun cas la lumière à action prolongée n'a fait perdre au *Bacillus Citrulli* sa vitalité ou ses propriétés biologiques. L'espèce envisagée soumise à des recherches effectuées suivant la méthode de BESSON ou de GRIMBERT et LEGROS n'a présenté aucune propriété réductrice et aucun dégagement gazeux.

4° Le *Bacillus Citrulli* tire une meilleur parti des matières quaternaires organiques que des sels ammoniacaux. En l'absence de produits ternaires (alcools polyatomiques ou sucres) aucun produit chromogène ne peut être mis en évidence. Les produits quaternaires employés seuls sont inaptes à fournir la matière chromogène; celle-ci en effet nécessite la *présence d'un aliment ternaire*. En ce qui concerne l'assimilation des acides-aminés la fonction amine intervient seule dans la production du pigment. Les propriétés protéolytiques de notre organisme sont peu prononcées : le sérum de cheval coagulé n'est pas liquéfié. L'ovalbumine n'est pas attaquée ni dissoute. La gélatine n'est jamais liquéfiée par l'action de la bactérie. Celle-ci ne produit pas de ferment-lab sur milieu de lait mais cependant elle attaque le lactose et sécrète une caséase.

5° Le *Bacillus Citrulli Sartoryi* en présence de peptone attaque rapidement les sucres suivants : glucose, lévulose, maltose, saccharose, mannite, galactose. Il est capable d'attaquer également la glycérine, mais il ne profite que très peu de cet aliment. Des recherches spéciales ont été effectuées en vue d'examiner les propriétés cellulolytiques de l'espèce parasite; elles ont donné des résultats négatifs.

6° Les propriétés biologiques du *Bacillus Citrulli* peuvent être complétées par les faits suivants : il ne *produit pas d'hydrogène sulfuré.*

La *réaction* de l'*indol* effectuée par des méthodes précises sur milieu approprié a été *positive* de même que la recherche du nitrite par la réaction indol-nitreuse.

Par les propriétés précitées le *Bacillus Citrulli Sartoryi* est donc une espèce non réductrice qui acidifie le milieu par l'attaque des sucres sans produire de gaz et se rapproche ainsi du Bacille Typhique. La présence de cils péritriches et la décoloration par la méthode de GRAM viennent encore renforcer cette assertion. Mais les caractères culturaux, la présence dans certaines conditions d'une pseudo-capsule ainsi que l'aspect microscopique, rapprochent cette espèce du pneumobacille de FRIEDLÆNDER isolé par FASCHING dans les expectorations de malades grippés. Il en diffère cependant par le fait qu'il acidifie définitivement les milieux hydrocarbonés, se rapprochant ainsi du *Bacillus mucosus capsulatus* avec lequel il présente en outre les analogies suivantes : légère attaque de la dulcite et de la glycérine, pas de dégagement d'hydrogène sulfuré, pas de noircissement de la gélose au plomb, pas de dégagement de gaz et absence de propriétés réductrices.

De toutes ces bactéries le *Bacillus Citrulli Sartoryi* se distingue nettement par la production de substances chromogènes sécrétées dans le substratum aqueux. Par cette propriété notre bactérie doit être rangée d'après la classification de BEIJERINCK dans le groupe des « *chromopares* » qui excrètent la matière colorante à l'état soluble diffusible dans le milieu ambiant. Ce caractère à lui seul trace une ligne de démarcation très nette entre notre Bactérie et celles du groupe du *Bacillus prodigiosus* desquelles elle semble se rapprocher par le ton de la coloration apparaissant dans les milieux. D'autre part, cette propriété nous permet de la classer aux abords du groupe du *Bacillus pyocyaneus* avec toutefois cette différence que la fluorencence n'a jamais été constatée. De plus, il n'a jamais été possible, à notre connaissance, d'étudier dans ce groupe une substance chromogène possédant les propriétés physico-chimiques énumérées au cours de ce travail.

Le tableau groupant différentes espèces chromogènes avec leurs propriétés morphologiques et biologiques, joint à notre travail, permet de se rendre compte qu'il s'agit ici d'une espèce chromogène nouvelle isolée et étudiée pour la première fois et se distinguant nettement de toutes les bactéries à pigment signalées dans la littérature bactériologique. Par les propriétés physico-chimiques du colorant cette espèce doit être rangée définitivement à côté du *Bacterium coelicolor* Reiner-Muller et du *Bacterium anthocyaneum* Lehmann et Reiss.

7° La substance chromogène du *Bacillus Citrulli Sartoryi* a été isolée par nous à l'*état pur cristallisé* et a présenté les propriétés physiques et chimiques suivantes :

Le colorant possède les propriétés d'un *glucoside* et fait partie du groupe des anthocyanes isolées et caractérisées pour la première fois par Combes, Willstætter et son école. Notre colorant possède le poids moléculaire = 804.35; il est dédoublable en donnant naissance à une anthocyanidine identique à la *pélargonidine*. Le pourcentage en carbone de ce corps est = 58.35; en hydrogène = 3.63; en chlore = 10,48. Les chiffres exprimant la composition de la pélargonidine sont les suivants : C = 58,72, H = 3,62 et Cl = 10,93. D'autre part, la quantité de glucose renfermée dans le corps isolé par nous est de 68,07 %. La *formule du produit chromogène* sécrété par notre bactérie correspond, d'après ces données à

$$C^{33}H^{41}O^{20}Cl.$$

Le pigment possède toutes les propriétés des anthocyanes telles qu'elles ont été décrites par Willstætter d'un côté, par Reiner-Muller et Portheim de l'autre.

En ce qui concerne les *propriétés physiques* de notre colorant nous voyons que le virage peut être défini par une courbe qui est fonction de la concentration en ions H, de la température et enfin de la durée de séjour à une température donnée. Les pH compris entre 2.96 et 5,93 sont les moins influencés par la température et leur virage dépend presque uniquement de la concentration en ions H. Le sommet de la courbe se trouve au pH = 5.46 environ. Le virage des teintes s'effectue le plus brusquement pour des températures comprises entre + 55 ° et + 70 °. Dans ces conditions, la concentration limite nécessaire pour la production du virage est

réalisée pour un pH = 6,3. Tout ceci vient appuyer les résultats que nous avons exposés antérieurement et prouve bien nettement que nous avons affaire sans aucun doute à un *dérivé anthocyanique*, proche parent du *pyrylium* qui existe sous deux formes dont l'une donne des dérivés incolores tandis que l'autre fournit des sels colorés. Les sels des dérivés hydroxylés du pyrylium sont en général rouges; les dérivés dans lesquels l'hydrogène d'un OH est substitué par un métal sont bleus; enfin l'oxygène de l'OH combiné avec l'oxygène basique donne naissance à des composés violets.

Au cours de ce travail nous avons vu que les quatre modifications du colorant peuvent se produire dans les milieux de culture, ceci en égard avec la composition du milieu et avec les conditions auxquelles les cultures sont exposées.

L'*analyse spectroscopique*, effectuée dans des conditions rigoureuses, telles qu'elles ont été exposées dans les techniques données par Formanek et Lasseur nous a montré pour la substance anthocyanique *deux bandes d'absorption* dans le spectre visible. L'une s'étendant entre $\lambda = 588$ et $\lambda = 543$, l'autre entre $\lambda = 513$ et $\lambda = 489$. En ce qui concerne le sel anthocyanidique nous avons pu déterminer l'existence d'une bande très large située entre $\lambda = 568$ et $\lambda = 478$. Une deuxième bande d'absorption commence à $\lambda = 438$: l'intensité de celle-ci diminue de plus en plus jusqu'à disparition complète.

Ce spectrogramme présente une grande analogie avec celui de la pélargonidine indiquée par Willstætter et Zechmeister; ceci vient encore appuyer nos constatations antérieures.

L'*analyse biologique* du colorant au moyen de culture de la bactérie sur différents milieux à base d'hydrate de carbone employés seuls ou avec addition de différents sels tels que alun de potasse, chlorure de lithium, etc., nous a donné des résultats identiques à ceux de Reiner-Müller et Portheim.

La substance chromogène purifiée a été *inoculée* à des animaux de laboratoire. dans le but de la différencier des toxines bactériennes. Ces expériences ont montré que le colorant était *sans action toxique* sur ces animaux. Les tentatives d'anaphylaxie au moyen du produit coloré ont revêtu un caractère négatif. Le produit n'exerçait aucune action précipitante ou lytique vis-à-vis des globules de sang préparé, ce qui prouve que notre colorant n'entre pas dans le groupe des antigènes.

Nous croyons par conséquent avoir démontré par une expérimentation approfondie et rigoureuse que la substance chromogène sécrétée par le *Bacillus Citrulli Sartoryi* est un dérivé anthocyanique et c'est la première fois à notre connaissance qu'on a pu mettre en évidence avec toutes les garanties scientifiques, la production d'une telle substance rencontrée généralement chez les végétaux supérieurs par un microorganisme du groupe des *schizomycètes* selon la classification de VUILLEMIN.

Nous n'avons malheureusement pas pu mettre en évidence le moyen employé par la bactérie pour réaliser la synthèse biologique et le pouvoir constructeur du métabolisme bactérien en ce qui concerne la formation de la matière chromogène.

Il n'en est pas moins vrai que le *Bacillus Citrulli Sartoryi* peut, grâce à son pigment, trouver ses besoins énergétiques sur des substrats presque entièrement dépourvus de matière quaternaire organique et peut vivre en symbiose avec des organismes acidifiant fortement des milieux composés de substances ternaires.

NOTES BIBLIOGRAPHIQUES

Nos

116 AGGERY : Voir : Nicolas.

121 ALBACH : *Zeitschr. wiss. Mikroskopie*, Band 44, 1927, Seite 333.

113 ANDANT : C. R. Ac. Sciences 185, 713, 1928.

— Sur la fluorescence des Alcaloïdes, *Bull. Sciences Pharm.*, tome 37, n° 1, 2 et 3, 1930, page 31 et suivantes.

— Identification des produits pharmaceutiques par le spectre d'absorption et de fluorescence, Thèse Pharm. Paris, 1929.

33 ARNAUD : *C. R. Ac. Sciences*, tome C II, pages 1119, 1319, 1886; *Journ. Pharm. Chim.*, tome XIV, page 149.

10 BACHMANN : Spektroskopische Untersuchungen von Pilzfarbstoffen, 1886.

57 — Voir : Zopf.

112 BAYLE, FABRE et GEORGE : Contribution à l'analyse des corps fluorescents et son emploi, *Bull. Soc. Chim. France*, 4, 37, 1925, page 89; *Chim. Industrie* 17, 1927, page 179.

— Étude de la fluorescence considérée comme critérium de pureté des composés organiques, *Journal Pharm. et Chim.*, 1925, I., page 248.

66 BEIJERINCK : *Botan. Zeitung*, 1891, page 726.

128 — *Botan. Zeitung*, 1891, page 726.

43 BESSEY : *Flora*, Band XCIII, page 301, 1904.

1 BIZIO-BARTHOLOMEO : Voir : P. Spica Sulla materia colorante prodotta dal Micrococcus prodigiosus di P. Spica. M. E. Atti del rale instituto Veneto di scienzes, letture ed arti. Ser. 8 T. 2, 1899/1900. Disp. 10.

55 BŒHM : *Arch. exp. Pathol.*, Band XIX, page 60, 1885.

45 BOORSMA : *Chem. Zentralbl.*, 1896, Band I, page 1130.

Nos

30 Bouchardat : Voir : Vauquelin.

27 Brebeck : Voir : Fischer.

93 Combes : *C. R. Ac. des Sciences*, 157, 1002 et 1454, 1913.

94 — *C. R. Ac. des Sciences*, 150, 1186, 1910; 153, 886, 1911.

135 — *C. R. Ac. des Sciences*, 150, 1186, 1910.

100 Czartkowsky : Sitzungsbericht der Warschauer Gesell. der Wissensch., 1911, Seite 29.

105 Danckwortt et Pfau : Der Nachweis des Chlorophylls mit Hilfe der Analysen-Quarzlampe, *Arch. der Pharmaz. und Berliner Deutsche Pharmaz. Gesellschaft*, 265, 560, 1927.

98 Decker et Fellenberg : *Ann. der Chem.*, 356, 281, 1907 et 364, 1, 1908.

18 Demme : *Zentralbl. für Bakt.*, 1890, 9, Seite 271.

117 Doolittle : Control of Cucumber Mosaic in the Greenhouse, U. St. Dep. of Agricult Circular, 321, juillet 1924.

115 Dufrenoy : Les maladies du melon, *Ann.des Epiphyties*, VII, 1921, page 417.

48 Dragendorff et Podwyssotzky : *Arch. exp. Pathol*, tome VI, page 163, 1876.

23 Elfvings : Oefversigt af Finska Vetensk. Soc. Förh., Band 28.

79 Erdmann : *Journ. für praktische Chem.*, Leipzig 1866, page 385.

96 et 133 Erdmann : *Berichte der Deutschen Chem. Gesellschaft*, 11, 1870, 1878.

110 Ernst et Jentschitsch : Die Ultra-Violette Kapillaranalyse der pharmazeutischen Drogen, *Pharm. Post*, 1929.

111 Fabre : Sur un mode de détermination spectrophotométrique de solution à substance fluorescente, *Bull. Soc. Chim. France*, 4, 37, 1925, page 1304.

112 Fabre : Voir : Bayle.

98 Fellenberg : Voir : Decker.

Nos

27 Fischer et Brebeck : Zur Morphologie, Biologie und Systematik der Kammpilze, der Monilia candida und des Soorerregers, Jena 1894.

2 et 89 Fordos : Recherche sur la matière colorante des suppurations bleues : pyocyanine, *C. R. Ac. Sciences* 51, page 215, 1869.

7 Formanek : Voir : Lasseur. Contribution à l'étude des pigments microbiens.

19 Fresenius : Beiträge zur Mykologie, 1850-1863.

119 Gamaleia : Hétéromorphisme des bactéries sous l'influence de la caféine. Wratch, 1896, numéros 4 et 5. *Ref. Annales de Micrographie*, 1897, tome 9, p. 168.

123 — Hétéromorphisme des bactéries sous l'influence des sels de lithium, *Ann. de Micrographie*, tome VII, 1895, page 174.

44 Geerligs : *Chemik. Zeitung*, Band XIX, page 1311, 1895.

112 George : Voir : Bayle.

3 et 88 Gessard : De la Pyocyanine et de son microbe, Thèse méd., Paris, 1882.

— Des races du bacille pyocyanique, *Ann. Inst. Past.* 5, page 70, 1891 et 4, n° 2, 1890.

70 Girardet : Voir : Lasseur.

54 Griffiths : *C. R. Ac. Sciences*, tome CXXII, page 1342, 1896.

81 — *C. R. Ac. Sciences*, juillet et décembre 1892, p. 321.

104 Goppelsrœder : Capillaranalyse und das Emporsteigen der Farbstoffe in den Pflanzen, *Verhandlungen der Naturforschenden Gesellschaft*, Basel 1901, Band 14.

— Note sur une méthode nouvelle propre à déterminer la nature d'un mélange de principes colorants. *Bull. Soc. Industr., Mulhouse*, tome XXXII, 1862, Séance du 30 octobre 1861.

109 Haitinger : Voir : Reich.

21 Hansen : *Allgem. Brauer- und Hopfenzeitung*, 1887, 27, Seite 1109.

87 Hettche : Voir : Wrede.

Nos

71 HUEPPE et THUMM : *Arbeit. aus dem Bakteriolog. Inst. Karlsruhe*, I, 291, 1897.

32 HUSEMANN : *Liebigs Ann.*, Band CXVII, page 200, 1860

26 JANSEN et MERTENS : *La Cellule*, 1903, 20, 2e fasc., page 351.

110 JENTSCHITSCH ; Voir : Ernst.

37 KOHL : Untersuchungen über das Karotine, 1902.

107 KRAUSE : Voir : Danckwortt und Pfau, *Arch. der Pharm.*, Band 265, 1927, Seite 71.

86 KRAFT : Beiträge zur Biologie des Bacterium Prodigiosum und zum Chem. Verhalten seines Pigmentes. Diss. Würzburg, 1902.

107 KUNTZ : Voir : Krause.

24 LAURENT : *Ann. Inst. Pasteur*, 1888, 2, page 596.

25 LASCHÉ : *Der Braumeister*, Chicago, 1892, nº 9.

8 et 76 LASSEUR : Contribution à l'étude du bacillus chlororaphis, Thèse Sciences, Nancy 1911.

70 LASSEUR ET GIRARDET : Contribution à l'étude des pigments microbiens, Nancy 1927, page 44.

103 LASSEUR : Sur l'extraction des pigments bactériens, *C. R. Soc. Biol.*, 66e année, volume 76, 1914, page 819.

91 LEDDERHOSE : *Deutsche Zeitschrift für Hygiene*, 1888.

67 LEHMANN et NEUMANN : Bakteriologische Diagnostik, München 1912, *Lehmanns Med. Handatlanten*, Bd. X, II. Teil.

72 — idem, page 418.

74 LEHMANN et REISS : idem, page 65.

22 LINDNER : *Wochenschrift für Brauerei*, 1887, 4, S. 853.

46 LINOSSIER : *C. R. Ac. Sciences*, tome CXII, pages 489, 807, 1891.

91 MADINAVEITIA : La composicion Quimica de la Piocianina. Ann. Soc. Esp. Fiscia y Quimica, 14, 1916, p. 263.

75 MARPMANN : *Centralblatt für Bakteriologie*, IIte Abt., 4 Vol., S. 25.

26 MERTENS : Voir : Jansen.

114 et 125 MEYER : Voir : Sartory.

Nos

124 Meyer J. : Contribution à l'étude de l'Aspergillus fumigatus Fresenius, Thèse Pharm., 1927, Strasbourg, page 21.

34 Mieg : Voir : Willstætter.

42 Milburn : *Zentralblatt für Bakteriologie*, Abt. II, Band XIII, page 269, 1904.

6 et 77 Molisch : Die Purpurbakterien. Jena, Fischer, 1907.

35 Molisch : *Berl. Bot. Gesellsch.*, Band XIV, page 18, 1896.

39 Nadson : Die Pigmente der Pilze, 1891, *Botan. Zentralblatt*, Band L, page 108, 1892.

122 Nepveux : Le Bacillus Bruntzii, Paris, Jouve et Cie, 1920, page 31.

67 Neumann : Voir : Lehmann.

116 Nicolas et Aggery : Une maladie bactérienne de quelques Cucumis, *Revue Path. Vég. et Entom. Agricole*, tome XVI, 1929, page 39.

60 Oudemans : *Rec. Travaux Chim. Pays-Bas*, tome II, page 155, 1883.

92 Overton : *Jahrbuch für Wissen. Bot.*, Band XXXIII, page 171, 1899.

49 Palm : *Zeitschr. Analyt. Chem.*, Band XXII, page 319, 1883.

53 Phipson : *Chem. News*, volume LVI, page 199, 1882.

105 et 129 Pfau : Voir : Danckwortt.

108 Platz : Ueber die Kapillaranalyse und ihre Anwendung im Pharmazeutischen Laboratorium. Voir : Pfau, *Apothekerzeitung*, Nr. 11, 1926, Seite 133, Jahrgang 41.

48 Podwyssotzky : Voir : Dragendorff.

101 Portheim : Ueber den Einfluss von Temperatur und Licht auf die Färbung des Anthokyans, *Anzeiger der Akad. Wissenschaften in Wien*, XV, 1914, pages 327 à 331.

109 Reich et Haitinger : Ueber das Verhalten von Trauben und Obstwein im ultra-violetten Licht. *Allgem. Weinzeitung*, 44, numéros 6, 7 et 18, 1927.

Nos

73 et 127 Reiner-Müller : *Zentralblatt für Bakteriologie*, Originale 1, 1908, 46, page 209.

— Eine Diphteridee und eine Streptothrix mit gleichem blauen Farbstoff.

52 Reinke : *Ann. Jardin Bot. Buitenzorg*, tome VI, page 74, 1886.

74 Reiss : Voir : Lehmann.

5 et 85 Rosenberg : Beiträge zur Kenntnis der Bakterienfarbstoffe, Thèse Méd., Würzburg, 1899.

114 Sartory A. & R. et J. Meyer : Une maladie du melon occasionnée par un Fusarium et une Bactérie chromogène, *C. R. Ac. Sciences*, mai 1929.

125 — Contribution à l'étude d'une nouvelle Bactérie chromogène, *C. R. Soc. Biologie*, juillet 1929.

130 — Nouvelle contribution à l'étude d'un pigment microbien, *C. R. Soc. Biologie*, 14 février 1930.

4 Scheurlen, Rosenberg und Schottelius : Biologische Untersuchungen über den Micrococcus prodigiosus, Leipzig, 1887.

82 Scheurlen : Geschichtliche und experimentelle Studien über den Prodigiosus. *Arch. für Hygiene*, 1896, Band 26, Seite 1.

28 Schimon : Beiträge zur Kenntnis rotgefärbter niederer Pilze, München, 1911.

69 et 84 Schneider : Die Bedeutung der Bakterienfarbstoffe für die Unterscheidung der Arten. *Arb. aus Bakt. Inst. Karlsruhe*, Band 1, 1897, Seite 203.

106 Schœnbein : Verhandlungen der Naturfreunde Gesellschaft Basel, 4. Teil, 1. Heft, 1864 und 3. Teil, II. Heft, 1861, Seite 249-255.

83 Schottelius : Biologische Untersuchungen über den Micrococcus prodigiosus, Leipzig, 1887, page 185.

20 Schrœter : Beiträge zur Biologie der Pflanzen, II. Heft, 1872, Seite 110.

80 — Beiträge zur Biologie der Pflanzen, 1875, page 109.

65 Schrœtter et Kristelli : *Zentralblatt für Bakteriologie*, 1, Band XVIII, page 781, 1895.

13 Sorby : *Proc. Roy. Soc.*, 1873, vol. XXI, page 457.

126 Sœrensen : *C. R. Lab. Carlsberg*, VII., 1., 1907.

Nos

61 STAHLSCHMIDT : *Liebigs Ann.*, Band CXCV, page 365, 1879.

107 STOHMANN : Voir : Danckwortt et Pfau, *Arch. der Pharm.*, 1927, Band 265, Seite 71.

90 STRACK : Voir Wrede.

56 TAYLOR : *Inst. Bot. Jahresbericht*, 1889, Band 1, p. 53.

62 et 78 THIRY : Bacille polychrome et actinomyces mordoré, Nancy, 1900, pages 90-92.

120 — idem, page 21.

137 THOMAS : Cours de Chimie biologique II, 1929, page 307, Paris, *Presses Universitaires de France.*

68 et 102 THUMM : Beiträge zur Biologie der fluorescierenden Bakterien. *Arb. aus Bakt. Institut Karlsruhe*, 1. Band, 1897, Seite 293.

71 THUMM : Voir : Hueppe.

50 TICHOMIROW : *Pharmazeutische Zeitschrift für Russland*, 1885, page 241.

36 TSCHIRCH : Untersuchungen über das Chlorophyll und andere Pflanzenpigmente, 1884.

30 VAUQUELIN et BOUCHARDAT : *Journal de Chimie*, 1830, Vol. LVIII, page 65.

47 VAUQUELIN : *Ann. de Chimie-physique*, tome III, page 337, 1816.

41 VUILLEMIN : *C. R. Ac. Sciences*, tome CXXXIV, p. 366, 1902.

118 — Genera, Schizomycetum, *Ann. Mycolog.*, tome XI, 1913, page 512.

29 WACKENRODER : Dissertatio de Anthelminticis, Göttingen, 1826.

40 WEHMER : *Zentralblatt für Bakteriologie*, II. Abt., Band VI, page 362, 1900.

131 WEIGERT : Jahresbericht der Oenol. und Pomolog. Lehranstalt Klosterneuburg, 1895.

51 WEISS : Wiener Akad. Sitzungsberichte Band XCI, 1., page 446, 1885.

34 WILLSTÆTTER et MIEG : Voir : Euler, Grundlagen und Ergebnisse der Pflanzenchemie, Braunschweig, 1908, 1. Teil, Seite 135.

Nos

95 et 132 WILLSTÆTTER et EVEREST : Untersuchungen über die Anthocyane, *Ann. der Chem.*, Band 401, 1913, Seite 189 und Seite 196.

99 WILLSTÆTTER et ZECHMEISTER : Synthese des Pelargonidins, *Sitzungsberichte Preuss. Akad. Wissensch.*, Berlin, 1914, II., Seite 887.

97 WILLSTÆTTER : Ueber Farbstoffe der Blüten und Früchte, *Sitzungsberichte Preuss. Akad. Wissensch.*, Berlin, 1914, I., Seite 409.

136 — idem., S. 402 und 1914, II., Seite 769, 886.

9 et 87 WREDE et HETTCHE : Ueber das Prodigiosin, den roten Farbstoff des Bacillus Prodigiosus. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 1929, 62, Seite 2678.

90 WREDE et STRACK : Ueber das Pyocyanin, den blauen Farbstoff des Bacillus Pyocyaneus, *Zeitschrift für physiol. Chem.*, 140, 1924, S. 1; 142, 1925, S. 103; 177, 1928, S. 177; 181, 1929, S. 58.

99 ZECHMEISTER : Voir : Willstætter.

31 ZEISE : *Journ. Prakt. Chem.*, Band XL, page 297, 1897.

11 ZOPF : Die Pilze, 1890, *Schenks Handbuch der Botanik*, Band IV, page 414; *Flora*, 1889, page 354.

12 — Beitrag zur Physiol. und Morphol. nieder. Org., Heft 2, 1892, page 3.

14 — idem, Heft 3, 1893, page 26.

15 — *Bericht Bot. Gesellsch.*, Band XVIII, 1900, page 466.

16 et 58 — *Flora*, 1889, S. 353 und *Beitr. Phys. und Morph. nieder. Org.*, 1892, Heft 2.

17 — *Bericht. Bot. Gesellsch.*, Band IX, page 27, 1891.

38 — *Schenks Handbuch der Botanik*, Band IV, page 418, 1890.

59 — *Botanische Zeitung*, 1889, page 69.

63 — *Zeitschrift Wissenschaftl. Mikrosk.*, Band VI, page 172 1889.

64 — *Bot. Zeitung*, 1889, page 53 et *Overbeck, Kochs Jahresbericht*, 1891, page 85.

TABLE DES FIGURES

Page

Fig. I. Cristaux de Picrate cristallisés en solution aqueuse 137

» II. Cristaux de Sulfate cristallisés en solution sulf. eau-alc... ..... »

» III. Cristaux de chlorhydrate hydrolysés et cristallisés en solution alc. amylique..... »

» IV. Bactérie en bâtonnet sur milieu asparagine-glucose (coloration violet de gentiane) ..... »

» V. Bactéries en bâtonnet réunies en chaînettes sur milieu peptone ..... »

» VI. Bactérie vivante à l'ultra-microscope (G = 2000) »

» VII. Bactérie en forme de coccobacille sur milieu sucré solide ..... »

» VIII. Bactérie vivante à l'ultra-microscope..... »

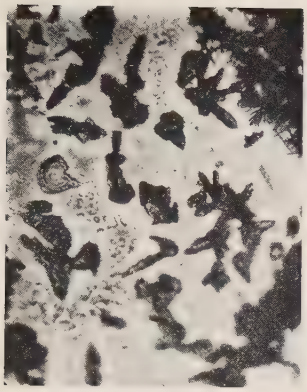


Fig 1.
Cristaux de Picrate
cristallisés en sol aqueux
(Leitz. Obj 2 - Oc 1 Makam)

Fig. II
Cristaux de Sulfate
cristallisés en solut sulf. de zinc
(Leitz Obj 2 Ocul Makam)

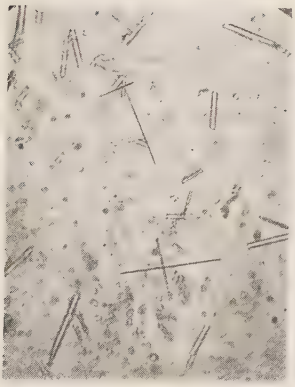


Fig III
Cristaux de Chlorhydrate
[illegible] cristal
[illegible] en sol alcoolique
(Leitz Obj 2 Ocul Makam)

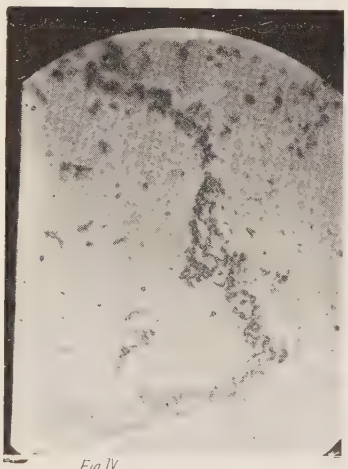


Fig IV
Bactérie en bâtonnet
sur milieu asparagine.
glucose coloration violette
de gentiane.
Objectif immersion 1/20.
Couleur Makam.

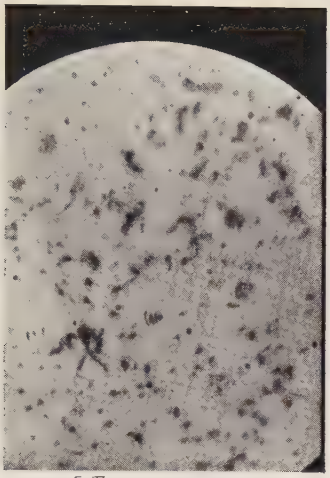


Fig V
Bacteries en bâtonnet
reunies en chainette
sur milieu jeptone
Coloration violet de
gentiane
(obj. immersion 1/15
oculaire Makam

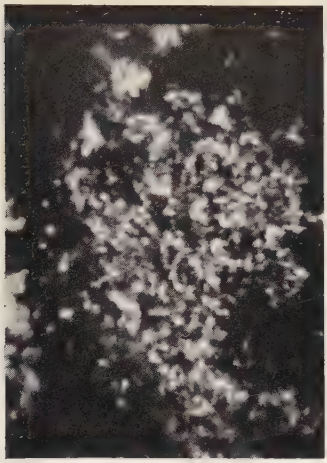


Fig VI.
Bacterie vivante
à l'ultra-microscope
G = 2.000
(Obj 1/18 immers.
oculaire 4)

Fig VII.
Bacterie en forme de
cocco-bacille coloration
violet de gentiane.
en milieu sucré solide
(obj. 1/15 immersion.
oculaire Makam)

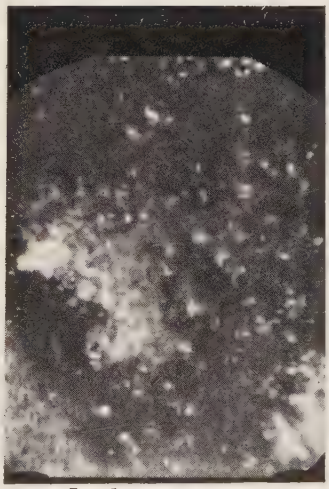


Fig VIII
Bactérie vivante
à l'ultra-microscope
(obj. immers 1/12.
oculaire 6)

TABLE DES MATIÈRES

Page

Introduction 5

PREMIÈRE PARTIE:

Historique 9

Chapitre I : Champignons chromogènes 9

Chapitre II : Les Bactéries à pigment bleu, violet ou rouge 16

Chapitre III : Principales substances chromogènes bactériennes bleues ou rouges étudiées jusqu'à présent 21

A) La Prodigiosine 21

B) La Pyocyanine 23

C) Les Anthocyanes 27

Chapitre IV : Essais d'isolement des pigments bactériens employés au cours de nos travaux. 37

Méthodes chimiques et physiques de caractérisation des pigments bactériens..... 37

1° Méthode chimique modifiée de Thumm 37

2° Méthode chimique de Grimbert-Lasseur 38

3° Méthode physique de Goppelsrœder basée sur l'analyse capillaire..... 40

DEUXIÈME PARTIE:

Étude morphologique et biologique du Bacillus Citrulli Sartoryi, ses caractères culturaux et biochimiques 45

Chapitre I : Étude morphologique 45

1° Origine 45

2° Mobilité 51

3° Coloration..... 55

4° Dimensions..... 56

Page

Chapitre II : Propriétés biologiques 58
1° Action de la chaleur 60
2° Action de la lumière 61
3° Aérobiose et Anaérobiose 62

Chapitre III : Caractères culturaux sur les différents milieux 63
1° Bouillon de viande glycériné 64
2° Bouillons sucrés 66
3° Solution de peptone gélosée 67
4° Milieux végétaux 69
5° Milieux synthétiques 69

Chapitre IV : Propriétés biochimiques 71
1° Action du Bacille sur les matières azotées et hydrocarbonées 71
A) Cultures sur milieux minéraux, renfermant comme source d'azote un sel ammoniacal minéral 74
B) Cultures sur milieux renfermant comme source d'azote un acide aminé ou amide, un sel ammoniacal d'acide organique 74
C) Cultures sur milieux en présence d'alcools polyatomiques ou de sucres 75
D) Cultures sur milieux renfermant des sels ammoniacaux minéraux et des substances hydrocarbonées. 76
E) Cultures sur milieux renfermant des substances quaternaires organiques et des sucres 76
2° Recherches des propriétés protéolytiques 78
3° Recherche de l'hydrogène sulfuré ... 79
4° Recherche de l'Indol 79
5° Recherche des nitrates 80
6° Action sur le lait 80
7° Action sur les sucres 81
8° Action vis-à-vis de la cellulose 81
9° Recherche sur la différence du métabolisme assimilateur du Bacillus Citrulli Sartoryi en culture incolore et en culture colorée. 82

Page

TROISIÈME PARTIE:

Étude de la substance chromogène..... 88

Chapitre I: Généralités 88

Chapitre II: Conditions de production du pigment ... 91

Propriétés physiques et chimiques 91

a) Conditions physiques 91

b) Conditions chimiques 98

c) Propriétés du pigment sur les milieux culture 100

Chapitre III: Essais de séparation du colorant 103

— Premier essai de séparation par la méthode capillaire de Goppelsrœder 103

— Deuxième essai par l'action de différents solvants 103

— Troisième essai. Purification et caractérisation de la matière chromogène par cristallisation 104

Chapitre IV: Caractérisation et constitution du colorant 108

Analyse élémentaire 108

Analyse ionométrique 112

Analyse spectroscopique 116

Analyse biologique..... 117

Conclusions 121

Notes bibliographiques 127

Table des figures 135

Table des matières..... 137

Vu :
Strasbourg, le 1er juillet 1930
Le Président du Jury,
A. SARTORY

Vu et approuvé :
Strasbourg, le 2 juillet 1930
Le Doyen de la Faculté de Pharmacie,
F. JADIN

Vu et permis d'imprimer :
Strasbourg, le 5 juillet 1930
Le Recteur de l'Académie,
Président du Conseil de l'Université
CH. PFISTER

Imprimerie des Dernières Nouvelles de Strasbourg